

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-545384

(P2023-545384A)

(43)公表日 令和5年10月30日(2023.10.30)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/35 (2006.01)	C 1 2 N	15/35	Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/015 (2006.01)	C 0 7 K	14/015		4 C 0 8 4
C 1 2 N	7/01 (2006.01)	C 1 2 N	7/01		4 C 0 8 7
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12		4 H 0 4 5
C 1 2 N	15/52 (2006.01)	C 1 2 N	15/52	Z	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全101頁)	最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-519433(P2023-519433)	(71)出願人	520135611
(86)(22)出願日	令和3年10月7日(2021.10.7)		リジェネックスバイオ インコーポレイ
(85)翻訳文提出日	令和5年3月28日(2023.3.28)		テッド
(86)国際出願番号	PCT/US2021/054058		アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8
(87)国際公開番号	WO2022/076750		5 0, ロックビル, メディカル センター
(87)国際公開日	令和4年4月14日(2022.4.14)		ドライブ 9 8 0 4
(31)優先権主張番号	63/088,988	(74)代理人	100092783
(32)優先日	令和2年10月7日(2020.10.7)		弁理士 小林 浩
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100103182
			弁理士 日野 真美
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA ,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR ,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く	(74)代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74)代理人	100196966
			弁理士 植田 渉
		(72)発明者	ダノス, オリビエ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 中枢神経系または筋肉送達のための組換えアデノ随伴ウイルス

(57)【要約】

本発明は、所望の特性を付与及び／または増強するアミノ酸配列及び／またはアミノ酸置換、特に参照カプシドを有するrAAVと比較してCNSまたは筋肉細胞における形質導入の増加を含むように操作されたカプシドタンパク質を有する組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)に関する。

【選択図】図1

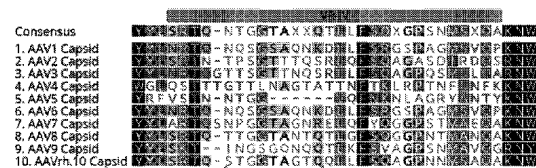


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型または非操作カプシドタンパク質と比較して1つ以上のアミノ酸置換を含む組換え A A V カプシドタンパク質であって、前記 r A A V カプシドタンパク質が、S 2 6 3 G / S 2 6 9 R / A 2 7 3 T 置換、G 2 6 6 A 置換、N 2 7 2 A 置換、W 5 0 3 R 置換、Q 4 7 4 A 置換、4 9 6 - N N N / A A A - 4 9 8 置換を有する A A V 9 カプシドタンパク質（配列番号 6 7）であり、Q 5 8 8 と A 5 8 9 との間、S 2 6 8 と S 2 6 9 との間、または S 4 5 4 と G 4 5 5 との間にペプチド T L A A P F K（配列番号 1）の挿入を有するか、あるいは A 2 6 9 S 置換もしくは 4 9 8 - N N N / A A A - 5 0 0 置換、または別の A A V 型カプシドのカプシドタンパク質における対応する置換もしくはペプチド挿入を有する A A V 8 カプシド（配列番号 6）である、前記組換え A A V カプシドタンパク質。

10

【請求項 2】

A A V 8 カプシドタンパク質（配列番号 6 6）の 4 9 8 - N N N / A A A - 5 0 0 アミノ酸置換、または A A V 9 カプシドタンパク質（配列番号 6 7）の 4 9 6 - N N N / A A A - 4 9 8 アミノ酸置換、または別の A A V 型カプシドのカプシドタンパク質における対応する置換をさらに含む、請求項 1 に記載の組換え A A V カプシドタンパク質。

【請求項 3】

A A V 8 . B B B . L D カプシド（配列番号 2 7）、A A V 9 . B B B . L D カプシド（配列番号 2 9）、A A V 9 . 4 9 6 - N N N / A A A - 4 9 8 カプシド（配列番号 3 1）、A A V 9 . 4 9 6 - N N N / A A A - 4 9 8 カプシド（配列番号 3 2）、A A V 9 . W 5 0 3 R カプシド（配列番号 3 3）、A A V 9 . Q 4 7 4 A カプシド（配列番号 3 4）、A A V 9 . N 2 7 2 A . 4 9 6 - N N N / A A A - 4 9 8 カプシド（配列番号 9 1）、または A A V 9 . N 2 6 6 A . 4 9 6 - N N N / A A A - 4 9 8 カプシド（配列番号 9 2）である、請求項 1 または 2 に記載の組換え A A V カプシドタンパク質。

20

【請求項 4】

前記アミノ酸置換または挿入が、A A B P H P . e B カプシド、タンパク質、または A A V 8 カプシドを含む、A A V 9 カプシド内にある、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の組換え A A V カプシドタンパク質。

【請求項 5】

前記 A A V 型カプシドが、A A V r h . 3 4、A A V 4、A A V 5、A A V h u . 2 6、A A V r h . 3 1、A A V h u . 1 3、A A V h u . 2 6、A A V h u . 5 6、A A V h u . 5 3、A A V 7、A A V r h . 1 0、A A V r h . 6 4 . R 1、A A V r h . 4 6 または A A V r h . 7 3 である、請求項 1 または 2 に記載の組換え A A V カプシドタンパク質。

30

【請求項 6】

r A A V ベクターに組み込まれると、前記 r A A V ベクターが、前記アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに前記対応する野生型カプシドタンパク質を組み込む r A A V ベクターと比較して、C N S 細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを増加させている、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の組換え A A V カプシドタンパク質。

【請求項 7】

r A A V ベクターに組み込まれると、前記 r A A V ベクターが、前記アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに前記対応する野生型カプシドタンパク質を組み込む r A A V ベクターと比較して、肝臓細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを減少させている、請求項 6 に記載の組換えカプシドタンパク質。

40

【請求項 8】

r A A V ベクターに組み込まれると、前記 r A A V ベクターが、前記アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに前記対応するカプシドタンパク質を組み込む r A A V ベクターと比較して、後根神経節細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを減少させている、請求項 6 または 7 に記載の組換えカプシドタンパク質。

【請求項 9】

50

r A A Vベクターに組み込まれると、前記r A A Vベクターが、前記アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに前記対応するカプシドタンパク質を組み込むr A A Vベクターと比較して、末梢神経細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを減少させている、請求項6～8のいずれか1項に記載の組換えカプシドタンパク質。

【請求項10】

r A A Vベクターに組み込まれると、前記r A A Vベクターが、前記アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに前記対応するカプシドタンパク質を組み込むr A A Vベクターと比較して、骨格筋及び／または心筋細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを増加させている、請求項1～5のいずれか1項に記載の組換えA A Vカプシドタンパク質。

【請求項11】

r A A Vベクターに組み込まれると、前記r A A Vベクターが、前記アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに前記対応するカプシドタンパク質を組み込むr A A Vベクターと比較して、肝臓細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを減少させている、請求項10に記載の組換えカプシドタンパク質。

【請求項12】

r A A Vベクターに組み込まれると、前記r A A Vベクターが、前記アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに前記対応するカプシドタンパク質を組み込むr A A Vベクターと比較して、C N S細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを減少させている、請求項10または11に記載の組換えカプシドタンパク質。

【請求項13】

r A A Vベクターに組み込まれると、前記r A A Vベクターが、前記アミノ酸置換なしに前記対応するカプシドタンパク質を組み込むr A A Vベクターと比較して、後根神経節細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを減少させている、請求項10～12のいずれか1項に記載の組換えカプシドタンパク質。

【請求項14】

請求項1～13のいずれか1項に記載のr A A Vカプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも80%の同一性を共有し、前記カプシドの生理活性を保持するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。

【請求項15】

請求項1～13のいずれか1項に記載のr A A Vカプシドタンパク質をコードする、請求項14に記載の核酸。

【請求項16】

前記ヌクレオチド配列によってコードされる前記カプシドタンパク質を含むA A Vベクターを生成するために請求項14または15に記載の核酸を発現することが可能なパッキング細胞。

【請求項17】

請求項1～13のいずれか1項に記載のカプシドタンパク質を含む、r A A Vベクター。

【請求項18】

前記筋肉細胞及び／またはC N S細胞内で発現するための調節配列に作動可能に連結された治療タンパク質をコードする導入遺伝子をさらに含む、請求項17に記載のr A A Vベクター。

【請求項19】

請求項17または18に記載のr A A Vベクターと、薬学的に許容可能な担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項20】

導入遺伝子を細胞に送達する方法であって、前記方法が、前記細胞を請求項17または18に記載のr A A Vベクターと接触させることを含み、前記導入遺伝子が、前記細胞に送達される、前記方法。

【請求項21】

前記細胞が、CNS細胞、心筋細胞または骨格筋細胞である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

導入遺伝子を、それを必要とする対象の標的組織に送達する方法であって、前記方法が、前記対象に、請求項17または18に記載のrAAVベクターを投与することを含み、前記導入遺伝子が、前記標的組織に送達される、前記方法。

【請求項23】

前記導入遺伝子が、筋疾患または心疾患治療薬であり、前記標的組織が、心筋または骨格筋である、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記rAAVが、静脈内または筋肉内を含めて全身投与される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記導入遺伝子が、CNS疾患治療薬であり、前記標的組織が、CNSである、請求項22に記載の方法。

【請求項26】

前記rAAVが、髄腔内または脳室内投与される、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

導入遺伝子を細胞に送達する際に使用するための薬学的組成物であって、請求項17または18に記載のrAAVベクターを含み、前記導入遺伝子が前記細胞に送達される、前記薬学的組成物。

【請求項28】

治療タンパク質をコードする導入遺伝子を、それを必要とする対象の標的組織に送達する際に使用するための薬学的組成物であって、請求項17または18に記載のrAAVベクターを含み、前記導入遺伝子が、前記標的組織に送達される、前記薬学的組成物。

【請求項29】

前記治療タンパク質が、筋疾患治療薬または心疾患治療薬であり、前記標的組織が、心筋または骨格筋である、請求項27または28に記載の薬学的組成物。

【請求項30】

前記rAAVが、参照AAVカプシドと比較して、心筋または骨格筋細胞内で少なくとも1.1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍大きい形質導入を示す、請求項27～29のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項31】

前記rAAVが、前記参照AAVカプシドと比較して、肝臓内で少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%少ない形質導入を示す、請求項27～30のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項32】

前記rAAVが、前記参照AAVカプシドと比較して、後根神経節細胞内で少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%少ない形質導入を示す、請求項27～31のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項33】

前記治療タンパク質が、CNS疾患治療薬であり、前記標的組織が、CNSである、請求項27、28または32のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項34】

前記rAAVが、参照AAVカプシドと比較して、CNS細胞内で少なくとも1.1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍大きい形質導入を示す、請求項27、28、32または33のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項35】

前記rAAVが、前記参照AAVカプシドと比較して、肝臓内で少なくとも50%、6

10

20

30

40

50

0 %、70 %、80 %、90 %、95 %または99 %少ない形質導入を示す、請求項27、28、33～34のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項36】

前記rAAVが、前記参照AAVカプシドと比較して、後根神経節細胞内で少なくとも50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 %または99 %少ない形質導入を示す、請求項27、28、32～35のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項37】

前記AAV参照カプシドが、AAV8またはAAV9である、請求項27～36のいずれか1項に記載の薬学的組成物。

【請求項38】

CNS障害の治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、治療有効量の、請求項27、28、32～37のいずれか1項に記載の薬学的組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項39】

筋障害の治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、治療有効量の、請求項27～31及び37のいずれか1項に記載の薬学的組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項40】

前記導入遺伝子が、表1Aまたは表1Bから選択される、請求項18に記載のrAAVベクター。

【請求項41】

前記導入遺伝子が、表1Aまたは表1Bから選択される、請求項20または22～26のいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】

前記導入遺伝子が、表1Aまたは表1Bから選択される、請求項27または28に記載の導入遺伝子の送達する際に使用するための薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

1. 発明の分野

本発明は、組織向性を含む所望の特性を付与及び／または増強する1つ以上のアミノ酸置換及び／またはペプチド挿入を有するカプシドタンパク質を有する組換えアデノ随伴ウイルス(rAAV)に関する。具体的には、本発明は、1つ以上の組織型に対するAAV血清型の向性を増強する1つ以上のアミノ酸置換またはペプチド挿入を含む操作されたカプシドタンパク質、ならびに操作されていないが、rAAVに筋肉またはCNS向性を付与することが見出されるカプシドを提供する。特に、AAVカプシド内の1つ以上のアミノ酸置換及び／または挿入は、肝臓及び／または後根神経節及び／または末梢神経細胞の向性を低減しながら、心臓及び／または筋肉組織または中枢神経系における形質導入、ゲノム組み込み及び／または導入遺伝子発現を改善する。本明細書に開示されるカプシドタンパク質を有するrAAVは、CNSまたは筋疾患の処置のための治療タンパク質をコードする導入遺伝子を送達するのに有用である。

【背景技術】

【0002】

2. 背景

遺伝子送達ベクターとしてのアデノ随伴ウイルス(AAV)の使用は、患者の満たされていない多くのニーズに対する処置のための有望な手段である。天然に存在する数十種のAAVカプシドが報告されており、霊長類の組織における種々の天然AAV配列のマイニングすることは、クレードに分布した100種を超えるバリエーションを特定した。AAVは、パルボウイルス科に属し、比較的小さなゲノム及び単純な遺伝子構成要素を有する一本鎖DNAウイルスである。AAVは、ヘルパーウイルスを伴わずに、潜伏感染を確立する

10

20

30

40

50

。AAVゲノムは、通常、ベクター生成のための複製及びパッケージングシグナルとして機能する、末端逆位反復（ITR）に挟まれたRep遺伝子及びCap遺伝子を有する。カプシドタンパク質は、ゲノムDNAを有し、かつDNAを標的細胞に送達するための組織向性を決定し得るカプシドを形成する。

【0003】

低い病原性及び長期の標的化遺伝子発現の有望性のため、組換えAAV（rAAV）は、治療配列が様々なカプシドにパッケージングされた遺伝子移行ベクターとして使用されてきた。そのようなベクターは、前臨床遺伝子療法研究において使用されており、20種を超える遺伝子療法製品が現在、臨床開発下にある。組換えAAV9粒子などの組換えAAVは、望ましい神経向性特性を実証しており、CNS疾患の処置のための組換えAAV9を使用した臨床試験が進行中である。筋肉及び／または心臓組織への送達も望ましい。肝臓及び／または後根神経節細胞の形質導入の低減はまた、毒性を低減するのに望ましい場合もある。しかしながら、ヒト対象におけるrAAVの向神経性または筋肉／心臓向性特性を増強する試みは、限定的な成功を収めている。

10

【0004】

例えば、中枢神経系に関連する障害の処置において、あるいは心臓及び／または筋肉における発現が望ましい場合に、有害作用を最小限に抑えるために肝臓及び／または後根神経節細胞及び／または末梢神経細胞における形質導入が最小限に抑えられた状態で使用するための神経向性が向上した、あるいは筋肉及び／または心臓特性の向性を有するrAAVベクターが、依然として必要とされている。治療剤を送達するための組織特異的標的化が向上した及び／または組織特異的形質導入が向上したrAAVベクターも必要とされている。

20

【発明の概要】

【0005】

3. 発明の概要

参照カプシド、例えば、親カプシドまたはAAV8もしくはAAV9カプシドと比較して、CNS及び／または筋肉組織におけるrAAVゲノムの組織標的化、形質導入及び／または組み込みを増強する1つ以上のアミノ酸置換及び／またはペプチド挿入を有するように操作されたカプシドタンパク質を有する組換えアデノ随伴ウイルス（rAAVs）が提供されるが、一方で、CNS及び／または筋肉における分布と比較して、及び／またはAAV8もしくはAAV9などの親カプシドまたは参照カプシドと比較して、肝臓及び後根神経節細胞などのある特定の組織において低減した生体内分布を有し、毒性を低減する。マウス及び非ヒト霊長類における生体内分布研究は、操作されたカプシドを含む、組織型のカプシドにおける相対的形質導入及び導入遺伝子転写及び発現の評価を可能にする（以下、実施例13～18を参照されたい）。したがって、参照カプシド（例えば、修飾された非操作親カプシドまたはAAV8もしくはAAV9）と比較して、CNS組織（前頭皮質、海馬、小脳、中脳を含む）における形質導入、ゲノム組み込み、導入遺伝子転写及び発現を含む、増強または増加した生体内分布を有し、CNS組織における生体内分布と比較して、及び／または親カプシドまたはAAV8もしくはAAV9などの参照カプシドを有するAAVと比較して、肝臓及び／または後根神経節細胞（頸部、胸部、及び／または腰部）における形質導入、ゲノム組み込み、導入遺伝子転写及び発現を含む、低減した分布を有する、rAAVが本明細書で提供される。そのようなrAAVは、CNS疾患の処置のための治療タンパク質を送達するのに有用であり得る。加えて、参照カプシド（例えば、非操作親カプシドまたはAAV8もしくはAAV9）と比較して、骨格筋及び／または心筋組織における形質導入、ゲノム組み込み、導入遺伝子転写及び発現を含む、増強または増加した生体内分布を有し、筋肉組織における生体内分布と比較して、及び／または親カプシドまたはAAV8もしくはAAV9などの参照カプシドを有するAAVと比較して、肝臓及び／または後根神経節細胞（頸部、胸部、及び／または腰部）における形質導入、ゲノム組み込み、導入遺伝子転写及び発現を含む、低減した分布を有する、rAAVが本明細書で提供される。そのようなrAAVは、筋疾患の処置のための治療タンパク

30

40

50

質を送達するのに有用であり得る。

【0006】

具体的には、CNSの細胞を（具体的には、野生型AAV8もしくはAAV9カプシドを有するrAAVよりも高いレベルで）優先的に形質導入（標的化）し、所定の実施形態において、野生型AAV8もしくはAAV9カプシドを有するrAAVと比較して、肝臓及び／または後根神経節及び／または末梢神経細胞において標的化もしくは形質導入しないか、または形質導入が低減している、1つ以上のアミノ酸置換（2、3もしくは4つのアミノ酸置換を含む）を有する、AAV9カプシドタンパク質またはAAV8カプシドタンパク質（それぞれ配列番号67もしくは66、及び図7に番号付けされているように）が提供される。他の実施形態において、心筋及び／または骨格筋の細胞を（具体的には、野生型AAV9カプシドを有するrAAVよりも高いレベルで）優先的に形質導入し、所定の実施形態において、野生型AAV8もしくはAAV9カプシドを有するrAAVと比較して、肝臓及び／または後根神経節及び／または末梢神経細胞において標的化もしくは形質導入しないか、または形質導入が低減している、1つ以上のアミノ酸置換（2、3もしくは4つのアミノ酸置換を含む）を有する、AAV9カプシドタンパク質またはAAV8カプシドタンパク質（それぞれ配列番号67もしくは66、及び図7に番号付けされているように）が提供される。そのようなアミノ酸修飾には、AAV9のS263F／S269T／A273T、及び他のAAV型カプシドにおける対応する置換（例えば、図7の配置による）、またはAAV9のW530R、Q474A、N272A、もしくはG266A、及び他のAAV型カプシドまたはAAV8のA269Sにおける対応する置換、及び他のAAVカプシドにおける対応する置換（例えば、図7の配置による）が含まれる。また、カプシド、特に、ペプチドTLAAPFK（配列番号1）がQ588とA589（本明細書ではPHP.hDYN）との間、もしくは代替的にS268とS269との間、もしくはS454とG455との間に挿入された、または対応する位置で別のAAVカプシドに挿入されたAAV9カプシドも提供される（例えば、図7を参照されたい）。または、代替的に、カプシドは、AAV9 PHP.eBカプシド（修飾A587D及びQ588Gを有し、G588とA589との間にペプチドTLAVPFK（配列番号20）が挿入され、138位と139位との間にペプチドTILSRSTQTG（配列番号15）が挿入される）、または対応するカプシドである。追加のカプシドは、例えば、AAV9のS454とG455との間、または代替的に、S268とS269との間、またはQ588とA589との間、または異なるカプシドの対応する位置に挿入された腎臓1ペプチドLPVASを有する。いくつかの実施形態において、カプシドは、AAV rh64R1のR697W置換を含むことができる。これらのアミノ酸置換及び挿入を有するカプシドは、AAV9カプシドのAAA（アラニン）による496～498、もしくはAAV8カプシドの498～500位でのNNN（アスパラギン）の置換、または他のAAV型カプシドにおける対応する置換をさらに有し得る。操作されたカプシドとしては、AAV8.BB.LD（AAV8のアミノ酸配列におけるA269S、498-NNN／AAA-500置換、配列番号66）、AAV9.BB.LD（AAV9のアミノ酸配列におけるS263G／S269T／A273T、496-NNN／AAA-498置換、配列番号67）、AAV9.496-NNN／AAA-498（配列番号31）、AAV9.496-NNN／AAA-498.W503R（配列番号32）、AAV9.W503R（配列番号33）、またはAAV9.Q474A（配列番号34）が挙げられる。他の例において、カプシドは、AAV9.N272A.496-NNN-498（配列番号91）またはAAV9.G266A.496-NNN-498（配列番号92）であり得る。他の実施形態において、カプシドは、操作されたカプシドではなく、AAVrh.10カプシド（配列番号69）、AAVrh.46カプシド（配列番号93）、AAVrh.64.R1カプシド（配列番号90）またはAAVrh.73カプシド（配列番号88）である。所定の実施形態において、形質導入は、GFP蛍光などの導入遺伝子の検出によって決定される。

【0007】

10

20

30

40

50

操作されるカプシドタンパク質は、AAV9カプシドタンパク質であってもよいが、AAV血清型1（配列番号59）、AAV血清型2（配列番号60）、AAV血清型3（配列番号61）、AAV血清型3B、AAV血清型4（配列番号62）、AAV血清型5（配列番号63）、AAV血清型6（配列番号64）、AAV7カプシドの451～461（配列番号65）、AAV8カプシドの451～461（配列番号66）、AAV血清型9（配列番号67）、AAV血清型9e（配列番号68）、AAV血清型rh10（配列番号69）、AAV血清型rh20（配列番号70）、及びAAV血清型hu.37（配列番号71）、AAV血清型rh39（配列番号73）、及びAAV血清型rh74（配列番号72または配列番号80）、AAV血清型rh.34、AAV血清型hu.60、AAV血清型rh.21、AAV血清型rh.15、AAV血清型rh.24、AAV血清型hu.5、AAV血清型hu（配列番号69）、AAV血清型rh64R1（配列番号90）、AAV血清型rh46（配列番号93）、及びAAV血清型rh73（配列番号88）（ある特定の配列の配置については図7、及び配列については表17を参照されたい）などの任意のAAVカプシドタンパク質であってもよい。いくつかの実施形態において、これらのベクターのカプシドは、操作されない。例えば、未修飾AAV血清型rh64R1（配列番号90）AAV血清型rh.10（配列番号69）AAV血清型rh46（配列番号93）、及びAAV血清型rh73（配列番号88）を、開示される方法及び組成物中で使用することができる。

10

【0008】

所定の実施形態において、筋肉、心臓またはCNS疾患の治療のための治療タンパク質をコードする導入遺伝子を含む、治療対象となる導入遺伝子を含むゲノムを有するrAAVを含む、本明細書に記載の操作されたカプシドを組み込んだrAAVが提供される。本明細書に記載のrAAVを生成するためのパッケージング細胞が提供される。本明細書に記載の操作されたrAAVの送達による処置の方法、及び本明細書に記載の操作されたrAAVを含む薬学的組成物も提供される。また、本明細書に記載の操作されたカプシドを有するrAAVを製造する方法も提供される。

20

【0009】

本発明は、非ヒト霊長類に投与されたときの、アミノ酸置換で操作されたrAAV9カプシドの構築、及び組織分布のアッセイを説明する例として以下に例示される。

【0010】

30

3.1. 実施形態

1. 野生型または非操作カプシドタンパク質と比較して1つ以上のアミノ酸置換を含む組換えAAVカプシドタンパク質であって、rAAVカプシドタンパク質が、S263G/S269R/A273T置換、G266A置換、N272A置換、W503R置換、Q474A置換、496-NNN/AAA-498置換を有するAAV9カプシドタンパク質（配列番号67）であり、Q588とA589との間、S268とS269との間、またはS454とG455との間にペプチドTLAAPFKの挿入を有するか、あるいはA269S置換もしくは498-NNN/AAA-500置換、または別のAAV型カプシドのカプシドタンパク質における対応する置換もしくはペプチド挿入を有するAAV8カプシド（配列番号6）である、組換えAAVカプシドタンパク質。

40

【0011】

2. AAV8カプシドタンパク質（配列番号66）の498-NNN/AAA-500アミノ酸置換、またはAAV9カプシドタンパク質（配列番号67）の496-NNN/AAA-498アミノ酸置換、または別のAAV型カプシドのカプシドタンパク質における対応する置換をさらに含む、実施形態1に記載の組換えAAVカプシドタンパク質。

【0012】

3. AAV8.BBB.LDカプシド（配列番号27）、AAV9.BBB.LDカプシド（配列番号29）、AAV9.496-NNN/AAA-498カプシド（配列番号31）、AAV9.496-NNN/AAA-498カプシド（配列番号32）、AAV9.W503Rカプシド（配列番号33）、AAV9.Q474Aカプシド（配列番号3

50

4)、AAV9.N272A.496-NNN/AAA-498カプシド(配列番号91)、またはAAV9.N266A.496-NNN/AAA-498カプシド(配列番号92)である、実施形態1または2に記載の組換えAAVカプシドタンパク質。

【0013】

4. アミノ酸置換または挿入が、AABPHP.eBカプシド、タンパク質、またはAAV8カプシドを含む、AAV9カプシド内にある、実施形態1～3のいずれか1つに記載の組換えAAVカプシドタンパク質。

【0014】

5. AAV型カプシドが、AAV rh.34、AAV4、AAV5、AAV hu.26、AAV rh.31、AAV hu.13、AAV hu.26、AAV hu.56、AAV hu.53、AAV7、AAV rh.10、AAV rh.64.R1、AAV rh.46またはAAV rh.73である、実施形態1または2に記載の組換えAAVカプシドタンパク質。

10

【0015】

6. rAAVベクターに組み込まれると、rAAVベクターが、アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに対応する野生型カプシドタンパク質を組み込むrAAVベクターと比較して、CNS細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを増加させている、実施形態1～5のいずれか1つに記載の組換えAAVカプシドタンパク質。

【0016】

7. rAAVベクターに組み込まれると、rAAVベクターが、アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに対応する野生型カプシドタンパク質を組み込むrAAVベクターと比較して、肝臓細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを減少させている、実施形態6に記載の組換えカプシドタンパク質。

20

【0017】

8. rAAVベクターに組み込まれると、rAAVベクターが、アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに対応するカプシドタンパク質を組み込むrAAVベクターと比較して、後根神経節細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを減少させている、実施形態6または7に記載の組換えカプシドタンパク質。

【0018】

9. rAAVベクターに組み込まれると、rAAVベクターが、アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに対応するカプシドタンパク質を組み込むrAAVベクターと比較して、末梢神経細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを減少させている、実施形態6～8のいずれか1つに記載の組換えカプシドタンパク質。

30

【0019】

10. rAAVベクターに組み込まれると、rAAVベクターが、アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに対応するカプシドタンパク質を組み込むrAAVベクターと比較して、骨格筋及び／または心筋細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを増加させている、実施形態1～5のいずれか1つに記載の組換えAAVカプシドタンパク質。

【0020】

11. rAAVベクターに組み込まれると、rAAVベクターが、アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに対応するカプシドタンパク質を組み込むrAAVベクターと比較して、肝臓細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを減少させている、実施形態10に記載の組換えカプシドタンパク質。

40

【0021】

12. rAAVベクターに組み込まれると、rAAVベクターが、アミノ酸置換またはペプチド挿入なしに対応するカプシドタンパク質を組み込むrAAVベクターと比較して、CNS細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを減少させている、実施形態10または11に記載の組換えカプシドタンパク質。

【0022】

13. rAAVベクターに組み込まれると、rAAVベクターが、アミノ酸置換なしに

50

対応するカプシドタンパク質を組み込む r A A V ベクターと比較して、後根神経節細胞への標的化、形質導入またはゲノム組み込みを減少させている、実施形態 10～12 のいずれか 1 つに記載の組換えカプシドタンパク質。

【0023】

14. 実施形態 1～13 のいずれか 1 つに記載の r A A V カプシドタンパク質をコードするヌクレオチド配列、またはそれと少なくとも 80 % の同一性を共有し、カプシドの生理活性を保持するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。

【0024】

15. 実施形態 1～13 のいずれか 1 つに記載の r A A V カプシドタンパク質をコードする、実施形態 14 に記載の核酸。

【0025】

16. 当該ヌクレオチド配列によってコードされるカプシドタンパク質を含む A A V ベクターを生成するために実施形態 14 または 15 に記載の核酸を発現することが可能なパッケージング細胞。

【0026】

17. 実施形態 1～13 のいずれか 1 つに記載のカプシドタンパク質を含む、r A A V ベクター。

【0027】

18. 筋肉細胞及び／または C N S 細胞内で発現するための調節配列に作動可能に連結された治療タンパク質をコードする導入遺伝子をさらに含む、実施形態 17 に記載の r A A V ベクター。

【0028】

19. 実施形態 17 または 18 に記載の r A A V ベクターと、薬学的に許容可能な担体とを含む、薬学的組成物。

【0029】

20. 導入遺伝子を細胞に送達する方法であって、当該細胞を実施形態 17 または 18 に記載の r A A V ベクターと接触させることを含み、当該導入遺伝子が当該細胞に送達される、当該方法。

【0030】

21. 細胞が、C N S 細胞、心筋細胞または骨格筋細胞である、実施形態 20 に記載の方法。

【0031】

22. 導入遺伝子を、それを必要とする対象の標的組織に送達する方法であって、当該対象に、実施形態 17 または 18 に記載の r A A V ベクターを投与することを含み、導入遺伝子が、当該標的組織に送達される、当該方法。

【0032】

23. 導入遺伝子が、筋疾患または心疾患治療薬であり、当該標的組織が、心筋または骨格筋である、実施形態 22 に記載の方法。

【0033】

24. r A A V が、静脈内または筋肉内を含めて全身投与される、実施形態 23 に記載の方法。

【0034】

25. 導入遺伝子が、C N S 疾患治療薬であり、当該標的組織が、C N S である、実施形態 22 に記載の方法。

【0035】

26. r A A V が、髄腔内または脳室内投与される、実施形態 25 に記載の方法。

【0036】

27. 導入遺伝子を細胞に送達する際に使用するための薬学的組成物であって、実施形態 17 または 18 に記載の r A A V ベクターを含み、当該導入遺伝子が、当該細胞に送達される、当該薬学的組成物。

10

20

30

40

50

【0037】

28. 治療タンパク質をコードする導入遺伝子を、それを必要とする対象の標的組織に送達する際に使用するための薬学的組成物であって、実施形態17または18に記載のrAAVベクターを含み、当該導入遺伝子が、標的組織に送達される、当該薬学的組成物。

【0038】

29. 当該治療タンパク質が、筋疾患治療薬または心疾患治療薬であり、当該標的組織が、心筋または骨格筋である、実施形態27または28に記載の薬学的組成物。

【0039】

30. rAAVが、参照AAVカプシドと比較して、心筋または骨格筋細胞内で少なくとも1.1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍大きい形質導入を示す、実施形態27～29のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

10

【0040】

31. rAAVが、参照AAVカプシドと比較して、肝臓内で少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%少ない形質導入を示す、実施形態27～30のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

【0041】

32. rAAVが、参照AAVカプシドと比較して、後根神経節細胞内で少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%少ない形質導入を示す、実施形態27～31のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

【0042】

33. 当該治療タンパク質が、CNS疾患治療薬であり、当該標的組織が、CNSである、実施形態27、28または32のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

20

【0043】

34. rAAVが、参照AAVカプシドと比較して、CNS細胞内で少なくとも1.1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍大きい形質導入を示す、実施形態27、28、32または33のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

【0044】

35. rAAVが、参照AAVカプシドと比較して、肝臓内で少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%少ない形質導入を示す、実施形態27、28、33～34のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

30

【0045】

36. rAAVが、参照AAVカプシドと比較して後根神経節細胞内で少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%少ない形質導入を示す、実施形態27、28、32～35のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

【0046】

37. AAV参照カプシドが、AAV8またはAAV9である、実施形態27～36のいずれか1つに記載の薬学的組成物。

【0047】

38. CNS障害の治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、治療有効量の、実施形態27、28、32～37のいずれか1つに記載の薬学的組成物を投与することを含む、当該方法。

40

【0048】

39. 筋障害の治療を必要とする対象においてそれを行う方法であって、治療有効量の、実施形態27～31及び37のいずれか1つに記載の薬学的組成物を投与することを含む、当該方法。

【図面の簡単な説明】

【0049】

4. 図面の簡単な説明

【図1】他のAAVの領域に対応する、残基L447～R476（残基451～459は

50

括弧で示されている)からのアデノ随伴ウイルス9型のVR-IVループ(AAV9 VR-IV)を含むカプシドアミノ酸配列の配列比較を示している。図は、それぞれ、配列番号49~54、50、及び55~58を、出現する順番に開示する。上の配列は、コンセンサス配列、配列番号48である。

【図2】カプシド可変領域VR-IV、VR-V及びVR-VIIIを示す、AAVカプシド構造のタンパク質モデルを示す。ボックスは、モデルにおいて表されるように、表面露出したアミノ酸を提供するVR-IVのループ領域を強調している。

【図3】野生型AAV9及び8種の候補修飾rAAV9ベクター(1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、及び1097)のmL当たりのゲノムコピー(GC/mL)の観点からの高パッケージング効率(力価)を示しており、候補ベクターは、それぞれ、残基I451~Q458からのAAV9 VR-IVの中の異なる部位の直後にFLAG挿入物を各々含有する。全てのベクターを、10mLの培養物中でルシフェラーゼ導入遺伝子とともにパッケージングした。エラーバーは、平均の標準誤差を表す。

【図4】抗FLAG樹脂への結合によるパッケージングされたベクターの免疫沈降によって確認された、8種の候補修飾rAAV9ベクター(1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、及び1097)の各々におけるVR-IVループFLAG挿入物の表面露出を実証している。

【図5】野生型AAV9(9-luc)、または8種の候補修飾(FLAGペプチドが挿入されている)rAAV9ベクター(1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、及び1097)の各々のいずれかにパッケージングされた、(導入遺伝子として)ルシフェラーゼ遺伝子を保有するカプシドベクターで形質導入されたLecl細胞における形質導入効率を示しており、形質導入活性は、9-lucの活性を100%としたルシフェラーゼ活性パーセントとして(A)、またはマイクログラム当たりのタンパク質の相対発光量(RLU)として(B)表されている。

【図6A】様々なペプチドの長さ及び組成のAAV9のS454の直後の挿入が、パッケージング細胞におけるAAV粒子の生成効率に影響を及ぼし得ることを例示している棒グラフを示している。様々な組成及び長さの10種のペプチドを、AAV9 VR-IVの中のS454の後に挿入した。トランスフェクトから5日後のトランスフェクトされた浮遊HEK293細胞の収穫された上清についてqPCRを実施した。棒グラフにおいて示された結果は、挿入物の性質が、HEK293細胞によってAAV粒子が生成され、分泌される能力に影響を及ぼすことを実証しており、全体収率(力価)によって示される。(エラーバーは、Y軸に括弧で記されているペプチドの平均長さの標準誤差を表す)。

【図6B】以下の細胞株の形質導入された細胞培養物の蛍光画像を示している: Lecl細胞株。AAV9野生型及びGFP導入遺伝子を含有するS454挿入ホーミングペプチドカプシドを使用して前述の細胞株に形質導入した。P1ベクターは、形質導入効率が極めて低いため画像に含まれず、P8ベクターは、力価が低いため含まれなかった。AAV9.S454.FLAGは、試験された全ての細胞タイプにおいて低い形質導入レベルを示した。

【図6C】以下の細胞株の形質導入された細胞培養物の蛍光画像を示している: HT-22細胞株。AAV9野生型及びGFP導入遺伝子を含有するS454挿入ホーミングペプチドカプシドを使用して前述の細胞株に形質導入した。P1ベクターは、形質導入効率が極めて低いため画像に含まれず、P8ベクターは、力価が低いため含まれなかった。AAV9.S454.FLAGは、試験された全ての細胞タイプにおいて低い形質導入レベルを示した。

【図6D】以下の細胞株の形質導入された細胞培養物の蛍光画像を示している: hCMC/D3細胞株。AAV9野生型及びGFP導入遺伝子を含有するS454挿入ホーミングペプチドカプシドを使用して前述の細胞株に形質導入した。P1ベクターは、形質導入効率が極めて低いため画像に含まれず、P8ベクターは、力価が低いため含まれなかった。AAV9.S454.FLAGは、試験された全ての細胞タイプにおいて低い形質導入

10

20

30

40

50

レベルを示した。

【図 6 E】以下の細胞株の形質導入された細胞培養物の蛍光画像を示している：C 2 C 1 2 細胞株。A A V 9 野生型及び G F P 導入遺伝子を含む S 4 5 4 挿入ホーミングペプチドカプシドを使用して前述の細胞株に形質導入した。P 1 ベクターは、形質導入効率が極めて低いため画像に含まれず、P 8 ベクターは、力価が低いため含まれなかった。A A V 9 . S 4 5 4 . F L A G は、試験された全ての細胞タイプにおいて低い形質導入レベルを示した。

【図 7 - 1】開始コドン V P 2 の後、及び可変領域 1 (V R - I)、可変領域 4 (V R - I V)、及び可変領域 8 (V R - V I I I) 内またはその付近の、異種ペプチドの挿入部位とともに A A V 1 ~ 9 e、3 B、r h 1 0、r h 2 0、r h 3 9、r h 7 3、r h 7 4 バージョン 1 及びバージョン 2、h u 1 2、h u 2 1、h u 2 6、h u 3 7、h u 5 1、及び h u 5 3 カプシド配列の配置を示し（全て灰色で強調表示）、各カプシドタンパク質の可変領域 8 (V R - V I I I) 内の特定の挿入部位は、記号「#」（A A V 9 のアミノ酸番号付けに従うアミノ酸残基 5 8 8 の後）によって示される。

【図 7 - 2】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 3】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 4】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 5】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 6】図 7 - 1 の続きである。

【図 7 - 7】図 7 - 1 の続きである。

【図 8】A A V ベクターの投与後の、マウス脳細胞における G F P (緑色蛍光タンパク質) 導入遺伝子のコピーを示す：A A V 9 ; A A V . P H P . e B (本明細書では、A A V 9 e (5 8 8 位と 5 8 9 位の間にペプチド T L A V P F K (配列番号 2 0) が挿入され、及び修飾 A 5 8 7 D / A 5 8 8 G を有する A A V 9) とも称される)、A A V . h D y n (5 8 8 と 5 8 9 の間に T L A A P F K (配列番号 1) を有する A A V 9)、A A V . P H P . S (5 8 8 位と 5 8 9 位の間にペプチド Q A V R T S L (配列番号 1 6) が挿入された A A V 9)、及び A A V . P H P . S H (5 8 8 位と 5 8 9 位の間にペプチド Q A V R T S H (配列番号 1 7) が挿入された A A V 9)。

【図 9】Q 5 8 8 と A 5 8 9 との間 (A)、V R - I I I の S 2 6 8 と S 2 6 9 との間 (B)、及び V R - I V の S 4 5 4 と G 4 5 5 との間 (C) の T L A A P F K (配列番号 1) のペプチド挿入を含む、組換え A A V 9 ベクターのアミノ酸配列を示し、各々挿入された T L A A P F K (配列番号 1) が太字で示されている。

【図 1 0】血液脳関門 (B B B) 細胞層を横断する A A V ベクターのインビトロトランスウェルアッセイ (A) を示し、結果は、A A V . h D y n (逆三角形によって示される) が A A V 9 (正方形) よりも速く、A A V 2 (円) よりも速く、かつより大きな範囲でアッセイの B B B 細胞層を横断することを示す (B)。

【図 1 1】操作されたカプシド及びネイティブカプシドのプールが静脈内に投与されたマウスからの脳 g D N A の次世代シーケンシング (N G S) 分析の結果を示しており、プールにおける異なるカプシドのマウスの組織における相対的存在量を明らかにしている。3 つの異なるプールをマウスに注射した。点線は、どのベクターと一緒にプールされていたかを示している。親 A A V 9 は、対照として各プールに含まれていた (プール 1 : B C 0 1、プール 2 : B C 3 1、プール 3 : B C 0 1)。プールの各カプシドのバーコードを表 6 a ~ 6 c に列挙する。

【図 1 2】雌の C 5 7 B l / 6 マウスにおける A A V . h D y n のインビボ形質導入プロファイルを示し、ナイーブマウス、または脳 (A)、肝臓 (B)、心臓 (C)、肺 (D)、腎臓 (E)、骨格筋 (F)、坐骨神経 (G)、及び卵巣 (H) に A A V 9 または A A V . h D y n のいずれかを注射されたマウスにおけるコピー数 / マイクログラム g D N A を示し、A A V . h D y n が、A A V 9 と比較して増加した脳の生体内分布を示す。

【図 1 3】脳全体にわたる A A V . h D y n からの G F P の分布を示し、ここで、線条体 (A)、海馬 (B)、及び皮質 (C) からの脳切片の免疫組織化学的染色の画像は、修飾

10

20

30

40

50

ベクターによる脳の包括的な形質導入を明らかにした。

【図 1 4】アミノ酸 4 5 4 の直後にホーミングペプチドの挿入を含有する遺伝子操作された A A V 9 ベクターのインビボでの腎臓対肝臓の形質導入効率比を示す。本研究で使用されるペプチドの詳細を表 6 に概説する。

【図 1 5】カニクイザルモデルの前頭皮質におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の相対的存在量（R A）を示す。

【図 1 6】それぞれ、カニクイザルモデルの海馬及び小脳におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の相対的存在量を示す。A A V . r h 3 4 の R A は、グラフの左側のシェーディングされた列によって示され、A A V 9 参照の R A は、グラフの中央のシェーディングされた列によって示される。A A V . r h 3 4 が、静脈内投与プール内で上位パフォーマンスのカプシドであることを示す。

10

【図 1 7】それぞれ、カニクイザルモデルの海馬及び小脳におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の相対的存在量を示す。A A V . r h 3 4 の R A は、グラフの左側のシェーディングされた列によって示され、A A V 9 参照の R A は、グラフの中央のシェーディングされた列によって示される。A A V . r h 3 4 が、静脈内投与プール内で上位パフォーマンスのカプシドであることを示す。

【図 1 8】F C における上位の 4 5 パフォーマー（A A V 9 に対する最高 R A）、ならびに頸部、胸部、及び腰部 D R G における下位の 4 5 パフォーマー（A A V 9 に対する最低 R A）のベン図を示し、A A V r h 3 4 カプシドは、カプシドのプールの中で 4 5 の各群に存在した唯一のカプシドとして示される。

20

【図 1 9】カニクイザルモデルの前頭皮質におけるウイルスゲノム（入力及び A A V 9 参照に正規化された）の R A を示す。

【図 2 0】カニクイザルモデルの海馬におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の R A を示す。

【図 2 1】カニクイザルモデルの中脳におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の R A を示す。

【図 2 2】カニクイザルモデルの小脳におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の R A を示す。

【図 2 3】カニクイザルモデルの頸部 D R G におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の R A を示す。

30

【図 2 4】カニクイザルモデルの腰部 D R G におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の R A を示す。

【図 2 5】I C V 投与後に前頭皮質、海馬、中脳及び小脳を形質導入する上位パフォーマンスの 1 5 カプシドのベン図を示す。図に示されるように、A A V 6、A A V 8、B B B、A A V . r h . 4 6、及び A A V 1 は、上位パフォーマンス群の各々に表される唯一の A A V であった。

【図 2 6】海馬を標的とする D R G に優しいカプシドを同定するために、海馬を形質導入する上位パフォーマンスの 4 5 カプシド、及び D R G に対する形質導入値が最も低い 4 5 カプシドのベン図を示す。図に示されるように、A A V . h u . 6 0、A A V . r h . 2 1、A A V . P H P . h B、A A V . r h . 1 5、A A V . r h . 2 4、A A V 9 . W 5 0 3 R、h u . 5、A A V 9 . Q 4 7 4 A、及び A A V . h u . 1 0 は、各群に表される唯一の A A V であった。

40

【図 2 7】肝臓への標的化を低減した筋肉標的化カプシドを同定するために、心臓、二頭筋、及び腓腹筋を形質導入する上位パフォーマンスの 4 0 カプシド、ならびに肝臓に対する形質導入値が最も低い 4 0 カプシドのベン図を示す。図に示されるように、A A V . P H P e B . V P 2 H e r p は、各群において表される唯一の A A V であった。

【図 2 8】心臓、二頭筋、及び腓腹筋を形質導入する上位パフォーマンスの 1 5 カプシドのベン図を示す。

【図 2 9 A】それぞれ、カニクイザルモデルの腓腹筋及び肝臓におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の R A を示す。

50

【図 29 B】それぞれ、カニクイザルモデルの腓腹筋及び肝臓におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の RA を示す。

【図 30】カプシドライブラリの IV 投与後に NHP の肝臓で検出された、選択された「肝臓脱標的化」（LD）ベクターの DNA（A）または RNA（B）のゲノムコピーの数を示す。

【図 31】カプシドライブラリの IV 投与後の NHP における、様々な組織における選択された「肝臓脱標的化」（LD）ベクターの、親 AAV9 カプシドと比較した生体内分布を示す。

【図 32】カプシドライブラリの IV 投与後の NHP における、様々な組織における選択された LD ベクターの、親 AAV8 カプシドと比較した生体内分布を示す。

【図 33 A】AAV9 と比較して、AAV9 形質導入（または肝臓形質導入）に影響を与える点変異の相対的存在量における変化を示す。本研究に示される 4 つの変異体は、野生型 AAV9 と比較して、血液中の貯留を実証する。

【図 33 B】親カプシド（それぞれ、AAV8 または AAV9）と比較して、NNN / AAA 変異をトランスポートモチーフ BBB（AAV8 の A269S、AAV9 の S263G / S269T / A273T）と組み合わせた AAV8 及び AAV9 変異体の相対的存在量における変化を示す。

【図 34】A は、AAV9 に対する 3 ～ 24 時間の血液貯留の増加を示す。B は、親 AAV と比較した 3 ～ 24 時間の血液貯留の増加を示す。

【図 35】カプシドライブラリの IV 投与後の野生型 B6 マウスにおける、心筋、ならびに大脳、肝臓及び脾臓を含む筋肉組織における選択された AAV ベクターの生体内分布を示す。

【図 36 A】mdx マウス組織と比較した、野生型 B6 マウスにおける様々なカプシドの生体内分布を示す。

【図 36 B】mdx マウス組織と比較した、野生型 B6 マウスにおける様々なカプシドの生体内分布を示す。

【図 36 C】mdx マウス組織と比較した、野生型 B6 マウスにおける様々なカプシドの生体内分布を示す。

【図 36 D】mdx マウス組織と比較した、野生型 B6 マウスにおける様々なカプシドの生体内分布を示す。

【図 36 E】mdx マウス組織と比較した、野生型 B6 マウスにおける様々なカプシドの生体内分布を示す。

【図 36 F】mdx マウス組織と比較した、野生型 B6 マウスにおける様々なカプシドの生体内分布を示す。

【図 36 G】mdx マウス組織と比較した、野生型 B6 マウスにおける様々なカプシドの生体内分布を示す。

【図 36 H】mdx マウス組織と比較した、野生型 B6 マウスにおける様々なカプシドの生体内分布を示す。

【発明を実施するための形態】

【0050】

5. 詳細な説明

参照カプシドタンパク質に対して操作されたカプシドタンパク質を有する組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）が提供され、その結果、rAAV は、特に、参照カプシドタンパク質（例えば、非操作型または野生型カプシド）、CNS または心筋及び／または骨格筋組織と比較して、形質導入、ゲノム組み込み及び導入遺伝子発現を含む組織標的化の増加などの所望の特性を増強する。実施形態において、操作されたカプシドは、AAV 遺伝子療法の毒性を低減するために、肝臓、後根神経節及び／または末梢神経組織の参照カプシドに対する向性（すなわち、rAAV ゲノムの組織標的化、形質導入及び組み込み）を低減した。修飾には、本明細書に記載のアミノ酸置換（1、2、3、4、5、6、7 もしくは 8 個のアミノ酸置換を含む）及び／またはペプチド挿入（4 ～ 20、もしくは 7 個の

10

20

30

40

50

連続するアミノ酸、及び実施形態において異種タンパク質由来の12個以下の連続するアミノ酸)が含まれる。操作されるAAVカプシドタンパク質は、所定の実施形態において、AAV9カプシドタンパク質またはAAV8カプシドタンパク質である。他の実施形態において、操作されるAAVカプシドは、AAV rh. 34、AAV4、AAV5、AAV hu. 26、AAV rh. 31、AAV hu. 13、AAV hu. 56、AAV hu. 53、AAV7、AAV rh64R1、AAV rh46またはAAV rh73カプシドタンパク質である。(配列については図7及び表17を参照されたい)【0051】

したがって、形質導入及び／または組織向性を促進する1つ以上のアミノ酸置換を有する操作されたカプシドが提供され、特に、心筋及び／または骨格筋を標的とする非操作カプシドと比較して増強され、ならびに実施形態において、肝臓、後根神経節、及び／または末梢神経組織を標的とする非操作カプシドと比較して低減される。実施形態において、アミノ酸置換は、AAV9のS263F/S269T/A273T、及び他のAAV型カプシドにおける対応する置換(例えば、図7の配置による)、またはAAV9のW530R、Q474A、N272A、もしくはG266A、及び他のAAV型カプシドまたはAAV8のA269Sにおける対応する置換、及び他のAAVカプシドにおける対応する置換(例えば、図7の配置による)である。また、カプシド、特に、ペプチドTLAAPFK(配列番号1)がQ588とA589(本明細書ではPHP.hDYN)との間、もしくは代替的にS268とS269との間、もしくはS454とG455との間に挿入された、または対応する位置で別のAAVカプシドに挿入されたAAV9カプシドも提供される(例えば、図7を参照されたい)。または、代替的に、カプシドは、AAV9 PHP.eBカプシド(修飾A587D及びQ588Gを有し、G588とA589との間にペプチドTLAVPFK(配列番号20)が挿入され、138位と139位との間にペプチドTILSRSTQTG(配列番号15)が挿入される)、または対応するカプシドである。追加のカプシドは、例えば、AAV9のS454とG455との間、または代替的に、S268とS269との間、またはQ588とA589との間、または異なるカプシドの対応する位置に挿入された腎臓1ペプチドLPVASを有する。いくつかの実施形態において、カプシドは、AAV rh64R1のR697W置換を含むことができる。これらのアミノ酸置換及び挿入を有するカプシドは、AAV9カプシドのAAA(アラニン)による496~498、もしくはAAV8カプシドの498~500位でのNNN(アスパラギン)の置換、または他のAAV型カプシドにおける対応する置換をさらに有し得る。操作されたカプシドとしては、AAV8.BB.LD(AAV8のアミノ酸配列におけるA269S, 498-NNN/AAA-500置換、配列番号66)、AAV9.BB.LD(AAV9のアミノ酸配列におけるS263G/S269T/A273T, 496-NNN/AAA-498置換、配列番号67)、AAV9.496-NNN/AAA-498(配列番号31)、AAV9.496-NNN/AAA-498.W503R(配列番号32)、AAV9.W503R(配列番号33)、またはAAV9.Q474A(配列番号34)が挙げられる。他の例において、カプシドは、AAV9.N272A.496-NNN-498(配列番号91)またはAAV9.G266A.496-NNN-498(配列番号92)であり得る。他の実施形態において、カプシドは、操作されたカプシドではなく、AAVrh.10カプシド(配列番号69)、AAVrh.46カプシド(配列番号93)、AAVrh.64.R1カプシド(配列番号90)またはAAVrh.73カプシド(配列番号88)である。所定の実施形態において、形質導入は、GFP蛍光などの導入遺伝子の検出によって測定される。これらのアミノ酸置換及び挿入を有するカプシドは、AAV9カプシドのAAA(アラニン)による496~498でのNNN(アスパラギン)の置換、または他のAAV型カプシドにおける対応する置換をさらに有し得る。この操作されたカプシドは、心筋及び／または骨格筋に対する優先的な標的化、ならびに肝臓及び／または後根神経節細胞及び／または末梢神経系組織に対する(非操作カプシドを有するAAVと比較して)低減された標的化を示し得、筋疾患の処置のための治療タンパク質をコードする導入遺伝子の送達に特に有用であり得る。

10

20

30

40

50

【0052】

別の実施形態において、操作されたAAV9カプシドタンパク質を含む組換えカプシドタンパク質、及びカプシドタンパク質を含むrAAVが提供され、ペプチドTLAVPFK（配列番号20）が、AAV9のG588とA589との間に挿入され、具体的には、カプシドタンパク質はまた、アミノ酸置換A587D/Q588G（PHP.eB）を有し、さらに、AAV9の138位（まとめて、AAVPHPeB.VP2Herp；表17を参照されたい）の後に、または別のAAVの対応する位置に挿入されたペプチドTILSRSTQTG（配列番号15）を有する。追加のカプシドは、例えば、AAV9のS454とG455の間（表17を参照されたい）、または代替的にS268とS269の間、またはQ588とA589の間、または異なるカプシドの対応する位置において、カプシドに挿入された腎臓1ペプチドLPVAS（配列番号6）（または代替的にCLPVASC（配列番号5））を有する。そのような操作されたカプシドは、心臓及び骨格筋に対する優先的な標的化、ならびに（非操作カプシドを有するAAVと比較して）肝臓及び／または後根神経節細胞に対する低下した標的化を示してもよく、筋疾患（限定されないが、筋ジストロフィーなど）の治療タンパク質をコードする導入遺伝子の送達に特に有用であり得る。

10

【0053】

実施形態において、操作されたrAAVは、AAV9カプシドもしくはAAV8カプシド、または親カプシドを含む参照AAVカプシドと比較して、心臓及び／または骨格筋細胞において少なくとも1.1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍大きな形質導入を示す。特定の実施形態において、筋肉は、腓腹筋、二頭筋、三頭筋及び／または心筋である。さらなる実施形態において、操作されたrAAVは、AAV9カプシドもしくはAAV8カプシド、または親カプシドを含む、参照AAVカプシドと比較して、参照AAVカプシドと比較して、肝臓における形質導入が50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%少ないことを示す。さらなる実施形態において、rAAVは、参照AAVカプシドと比較して、後根神経節細胞（頸部、胸部または腰部DRG細胞を含む）における形質導入が50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%少ないことを示す。増強及び／または低減した形質導入は、静脈内投与、筋肉内投与、または任意のタイプの全身投与、髄腔内投与またはICV投与によって、任意の投与様式であってよい。

20

30

【0054】

また、形質導入及び／または組織向性を促進する1つ以上のアミノ酸置換を有する操作されたカプシドが提供され、特に、CNSを標的とする非操作カプシドと比較して増強され、ならびに実施形態において、肝臓、後根神経節、及び／または末梢神経組織を標的とする非操作カプシドと比較して低減される。実施形態において、アミノ酸置換は、AAV8のA269S（または異なるAAV血清型カプシドにおける対応する位置）、AAV9のS263G/S269T/A273T（または異なるAAV血清型カプシドにおける対応する位置）、AAV9のN272AもしくはN266A（または異なるAAV血清型カプシドにおける対応する位置）、AAV9のQ474A（または異なるAAV血清型カプシドにおける対応する位置）、あるいはAAV9のW503R（または異なるAAV血清型カプシドにおける対応する位置）である。これらのアミノ酸置換及び挿入を有するカプシドは、AAV9カプシド（配列番号67）のAAA（アラニン）による496～498でのNNN（アスパラギン）の置換をさらに有し得る、もしくは代替的に有し得る、またはAAV8カプシド（配列番号66）のAAA（アラニン）による498～4500でのNNN（アスパラギン）の置換、もしくは他のAAV型カプシドにおける対応する置換を有し得る。この操作されたカプシドは、CNSに対する優先的な標的化、ならびに肝臓及び／または後根神経節細胞及び／または末梢神経系組織に対する（非操作カプシドを有するAAVと比較して）低減された標的化を示し得、CNS疾患の処置のための治療タンパク質をコードする導入遺伝子の送達に特に有用であり得る。

40

50

【0055】

また、CNS組織におけるrAAV細胞取込み、形質導入及び／またはゲノム組み込みを標的化及び／または促進するペプチドを挿入した組換えカプシドタンパク質、及びそれらを含むrAAVも提供され、ならびに実施形態において、肝臓、後根神経節、及び／または末梢神経組織を標的とする非操作カプシド、例えば、ペプチドTILSRSTQTG（配列番号15）、TLAVPFK（配列番号20）、またはTLAAPFK（配列番号1）と比較して低減された。特定の実施形態において、ペプチドTLAAPFK（配列番号1）は、AAV9のQ588とA589との間（AAV9.hDyn、表17を参照されたい）、または別のAAVの対応する位置に挿入される（図7を参照されたい）。代替的に、カプシドは、rh.34、rh.10、rh.46、rh.73、もしくはrh64.R1（配列については、図7もしくは表17）、またはrh.34、rh.10、rh.46、rh.73、もしくはrh64.R1の操作形態である。これらの操作されたカプシドは、CNSに対する優先的な標的化、ならびに肝臓及び／または後根神経節細胞及び／または末梢神経系組織に対する（非操作カプシドを有するAAVと比較して）低減された標的化を示し得、CNS疾患の処置のための治療タンパク質をコードする導入遺伝子の送達に特に有用であり得る。

10

【0056】

実施形態において、操作されたrAAVは、親カプシドまたはAAV8もしくはAAV9などの参照AAVカプシドと比較して、CNS組織において少なくとも1.1倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、または10倍大きな形質導入を示す。CNS組織は、前頭皮質、海馬、小脳、中脳及び／または菱脳のうちの1つ以上であり得る。さらなる実施形態において、操作されたrAAVは、親カプシドまたはAAV8もしくはAAV9などの参照AAVカプシドと比較して、肝臓における形質導入が50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%少ないことを示す。さらなる実施形態において、rAAVは、親カプシド、またはAAV8もしくはAAV9などの参照AAVカプシドと比較して、後根神経節細胞（頸部、胸部または腰部DRG細胞を含む）における形質導入が50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%少ないことを示す。増強及び／または低減した形質導入は、静脈内投与、筋肉内投与、または任意のタイプの全身投与、髄腔内投与またはICV投与によって、任意の投与様式であってよい。

20

30

【0057】

カプシドタンパク質を含む組換えベクターが、その薬学的組成物、カプシドタンパク質をコードする核酸、ならびに標的組織に関連する障害への標的送達、改善された形質導入、及び／または処置のために操作されたカプシドを有するカプシドタンパク質及びrAAVベクターを作製し、使用方法とともに提供される。

【0058】

全体を通して使用されるように、AAV「血清型」は、免疫学的に異なるカプシド、天然に存在するカプシド、または操作されたカプシドを有するAAVを指す。

【0059】

5.1. 定義

「AAV」または「アデノ随伴ウイルス」という用語は、ウイルスのパルボウイルス属のウイルスであるDependoparvovirusを指す。AAVは、天然に存在する「野生型」ウイルスに由来するAAV、天然に存在するcap遺伝子によってコードされるカプシドタンパク質を含むカプシドにパッケージングされたrAAVゲノムに由来する及び／または天然に存在しないカプシドcap遺伝子によってコードされるカプシドタンパク質を含むカプシドにパッケージングされたrAAVゲノムに由来するAAVであり得る。後者の例には、天然に存在するカプシドのアミノ酸配列内にペプチド挿入物を含むカプシドタンパク質を有するrAAVが含まれる。

40

【0060】

「rAAV」という用語は、「組換えAAV」を指す。いくつかの実施形態において、

50

組換え A A V は、r e p 及び c a p 遺伝子の一部または全てが異種配列で置換されている A A V ゲノムを有する。

【0061】

「r e p - c a p ヘルパープラスミド」という用語は、ウイルスの r e p 及び c a p 遺伝子機能を提供し、機能的 r e p 及び／または c a p 遺伝子配列を欠く r A A V ゲノムからの A A V の産生を補助するプラスミドを指す。

【0062】

「キャップ遺伝子」という用語は、ウイルスのカプシドコートを形成するか、または形成するのを助けるカプシドタンパク質をコードする核酸配列を指す。A A V の場合、カプシドタンパク質は、V P 1、V P 2、または V P 3 であり得る。

【0063】

「r e p 遺伝子」という用語は、ウイルスの複製及び生成に必要な非構造タンパク質をコードする核酸配列を指す。

【0064】

本明細書で使用される場合、「核酸」及び「ヌクレオチド配列」という用語には、D N A 分子（例えば、c D N A またはゲノム D N A）、R N A 分子（例えば、m R N A）、D N A 及び R N A 分子の組み合わせまたはハイブリッド D N A / R N A 分子、ならびに D N A または R N A 分子のアナログが含まれる。そのようなアナログは、例えば、イノシンまたはトリチル化塩基を含むがこれらに限定されないヌクレオチドアナログを使用して生成され得る。そのようなアナログはまた、例えば、ヌクレアーゼ耐性または細胞膜を通過する能力の増加などの分子に有益な属性を与える修飾された骨格を含む D N A または R N A 分子を含むことができる。核酸またはヌクレオチド配列は、一本鎖、二本鎖であり得、一本鎖部分及び二本鎖部分の両方を含むし得、三本鎖部分を含むし得るが、好ましくは二本鎖 D N A である。

【0065】

本明細書で使用される場合、「対象」、「宿主」、及び「患者」という用語は、互換的に使用される。本明細書で使用される場合、対象は、哺乳動物、例えば、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）または霊長類（例えば、サル及びヒト）、または所定の実施形態において、ヒトである。

【0066】

本明細書で使用される場合、「治療剤」という用語は、疾患または障害に関連する症状の治療、管理、または改善において使用され得る任意の薬剤であって、疾患または障害は、導入遺伝子によって提供される機能に関連するものを指す。本明細書で使用される場合、「予防的有効量」は、標的疾患または障害の予防または遅延において、それらに患う対象に投与したときに、標的疾患または障害の治療または管理に少なくとも 1 つの治療的利益を提供する薬剤の量（例えば、導入遺伝子によって発現される生成物の量）を指す。さらに、本発明の薬剤に関する治療的有効量は、単独での、または他の治療剤と組み合わせた場合の薬剤の量が、疾患または障害の処置または管理において少なくとも 1 つの治療的利益を提供することを意味する。

【0067】

本明細書で使用される場合、「予防剤」という用語は、疾患または障害の進行の予防、遅延、また緩慢化において使用され得る任意の薬剤であって、疾患または障害は、導入遺伝子によって提供される機能に関連するものを指す。本明細書で使用される場合、「予防有効量」は、標的疾患または障害の予防または遅延において、それらに素因がある対象に投与したときに、少なくとも 1 つの予防的利益を提供する予防剤の量（例えば、導入遺伝子によって発現される生成物の量）を指す。予防的有効量はまた、標的疾患または障害の発生を予防もしくは遅延させる、または標的疾患もしくは障害の進行を減速させるのに十分な薬剤の量、標的疾患もしくは障害の発症を遅延または最小化するのに十分な量、またはそれらの再発もしくは広がりや予防もしくは遅延させるのに十分な量を指し得る。予防的有効量はまた、標的疾患または障害の症状の増悪を予防または遅延させるのに十分な薬

10

20

30

40

50

剤の量を指し得る。さらに、本発明の予防剤に関する予防有効量は、単独での、または他の治療剤と組み合わせた場合の予防剤の量が、疾患または障害の予防または遅延において少なくとも1つの予防的利益を提供することを意味する。

【0068】

本発明の予防剤は、標的疾患または障害の「素因がある」対象に投与され得る。疾患または障害の「素因がある」対象は、疾患または障害の発症に関連する症状を示すか、またはそのような疾患または障害の遺伝的構成、環境曝露、または他の危険因子を有するが、症状が疾患または障害として診断されるレベルにまだ達していない対象である。例えば、（導入遺伝子によって提供される）欠損遺伝子に関連する疾患の家族歴を有する患者は、その素因があるものとして適する場合がある。さらに、原発性腫瘍の除去後に持続する休眠腫瘍を有する患者は、腫瘍の再発の素因があるものとして適格である場合がある。

【0069】

本明細書で使用される場合、「中枢神経系」（「CNS」）は、循環薬剤が血液脳関門を通過した後に到達する神経組織を指し、例えば、脳、視神経、脳神経、及び脊髄を含む。CNSにはまた、脊髄の中心管及び脳室を満たす脳脊髄液が含まれる。

【0070】

5.2. 組換えAAVカプシド及びベクター

参照カプシドタンパク質に対して操作されたカプシドタンパク質を有する組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）が提供され、その結果、rAAVは、特に、参照カプシドタンパク質（例えば、非操作型または野生型カプシド）、CNSまたは心筋及び／または骨格筋組織と比較して、形質導入、ゲノム組み込み及び導入遺伝子発現を含む組織標的化の増加などの所望の特性を増強する。実施形態において、操作されたカプシドは、AAV遺伝子療法の毒性を低減するために、肝臓、後根神経節及び／または末梢神経組織の参照カプシドに対する向性（すなわち、rAAVゲノムの組織標的化、形質導入及び組み込み）を低減した。修飾には、本明細書に記載のアミノ酸置換（1、2、3、4、5、6、7もしくは8個のアミノ酸置換を含む）及び／またはペプチド挿入（4～20、もしくは7個の連続するアミノ酸、及び実施形態において異種タンパク質由来の12個以下の連続するアミノ酸）が含まれる。

【0071】

5.2.1 アミノ酸置換を有する操作されたカプシド

いくつかの実施形態において、AAVカプシドは、CNSまたは心筋もしくは骨格筋への効果的な遺伝子送達を増加させ、肝臓及び／または後根神経節を脱標的化して毒性を低減し、及び／または中和抗体の免疫応答を低減する、選択された単一～複数のアミノ酸置換を導入することによって修飾された。

【0072】

特定の実施形態において、カプシドは、AAV9におけるW503R置換、Q474置換、N272AもしくはN266A置換、または別のAAV血清型における対応する置換、またはAAV8におけるA269S置換、または別のAAV血清型における対応する置換を含む1つ以上のアミノ酸置換を有する。Q474A置換を有するカプシドを有するrAAVは、骨格筋及び／または心筋またはCNS組織への送達に特に有用であり得、W503R置換を有するカプシドを有するrAAVは、CNS組織への送達に、特にrAAVを含む参照カプシドと比較して、肝臓及び／またはDRG内での形質導入を低減した場合に特に有用であり得る。他の置換としては、AAV9中のS263G／S269R／A273T置換、またはAAV9中のA587D／Q588G置換、または他のAAV血清型における対応する置換が挙げられる。いくつかの実施形態において、rAAVカプシドは、R697W置換を有することができる。これらのアミノ酸置換及び挿入を有するカプシドは、AAV9カプシドのAAA（アラニン）による496～498でのNNN（アスパラギン）の置換、またはAAV8カプシドのAAA（アラニン）による498～500でのNNN（アスパラギン）の置換、他のAAV型カプシドにおける対応する置換をさらに有し得る。アミノ酸置換のために使用され得、かつ参照カプシドであり得る他のAAV血

清型としては、AAV8、AAV rh.34、AAV4、AAV5、AAV hu.26、AAV rh.31、AAV hu.13、AAV hu.26、AAV hu.56、AAV hu.53、AAV7、rh64R1、rh46またはrh73が挙げられる。CNS送達のための特定の実施形態において、カプシドは、rh34であり、未修飾であるか、または本明細書に詳述されるように修飾される親カプシドとして機能する。

【0073】

静脈内投与されたrAAVベクターによるCNSへの効果的な遺伝子送達は、血液脳関門を通過することを必要とする。AAVrh.10カプシド上の重要な残基のクラスターは、マウスにおける脳血管系全体の輸送及び広範なニューロン形質導入を可能にしたことが最近報告されている。具体的には、AAVrh.10由来のアミノ酸N262、G263、T264、S265、G267、S268、T269、及びT273は、BBBを通過することを促進する重要な残基として同定された(Albright et al, 2018, Mapping the Structural Determinants Required for AAVrh.10 Transport across the Blood-Brain Barrier)。血液脳関門のrAAV通過、形質導入、肝臓の脱標的化及び／または免疫応答の低減を促進するAAV8及びAAV9カプシドなどのカプシド中のアミノ酸置換が同定されている。

【0074】

いくつかの実施形態において、修飾カプシドを有するrAAVの形質導入及び／または組織向性を促進する1つ以上のアミノ酸置換を有するカプシドが提供される。特定の実施形態において、アラニンをセリン(A269S)に置き換えるAAV8カプシドのアミノ酸269において単一の変異を有するカプシド(表5a~5c、本明細書においてAAV8.BBBと称される)、及び他のAAV型における対応する位置においてアミノ酸置換を有するカプシドが提供される。いくつかの実施形態において、以下の置換をもたらす、AAV9カプシドのアミノ酸263、269、及び273において複数の置換を有するカプシドが提供される：S263G、S269T、及びA273T(本明細書ではAAV9.BBBと称される)、または他のAAV型におけるこれらの位置に対応する置換。

【0075】

AAVカプシドへの露出は、中和抗体の免疫応答を生成することができる。この応答を克服する1つのアプローチは、AAV特異的中和エピトープをマッピングし、中和を回避することができるAAVカプシドを合理的に設計することである。高い中和力価を有する、無傷のAAV9カプシドに特異的なモノクローナル抗体が最近記載されている(Giles et al, 2018, Mapping an Adeno-associate Virus 9-Specific Neutralizing Epitope To Develop Next-Generation Gene Delivery Vectors)。エピトープを、カプシド上の3倍対称軸、特にAAV9の残基496-NNN-498及び588-QAQAQT-592(配列番号8)にマッピングした。カプシド変異誘発は、このエピトープ内の単一のアミノ酸置換が結合及び中和を著しく低減することを実証した。加えて、インビボ研究では、エピトープ内の変異が変異体ベクターに「肝臓脱標的化」表現型を付与することが示され、同じ残基がAAV9の向性にも関与することが示唆された。肝臓の脱標的化はまた、トリプトファンをアルギニンに置き換えるアミノ酸503の置換と関連している。AAV9カプシドにおけるW503R変異の存在は、低グリカン結合親和性と関連していた(Shen et al, 2012, Glycan Binding Avidity Determines the Systemic Fate of Adeno-Associated Virus Type 9)。

【0076】

いくつかの実施形態において、AAV8.BBB及びAAV9.BBBカプシドが、AAV8のアミノ酸位置498、499、及び500(本明細書ではAAV8.BBB.LDと称される)またはAAV9の496、497、及び498(本明細書ではAAV9.

10

20

30

40

50

BBB.LDと称される)においてアスパラギンをアラニンで置換することによってさらに修飾されたカプシドが提供される。いくつかの実施形態において、AAVrh10カプシドは、アミノ酸位置498、499、及び500において3つのアスパラギンをアラニン(AAVrh10.LD)に置換することによって修飾された(表5a~5c)。

【0077】

いくつかの実施形態において、アラニンで置換されたAAV9カプシドのアミノ酸位置496、497、及び498に3つのアスパラギンを有するカプシド、ならびにアルギニンでAAV9カプシドのアミノ酸503にトリプトファンを有するカプシド、または他のAAV型におけるこれらの位置に対応する置換を有するカプシドが提供される。いくつかの実施形態において、アラニンで置換されたAAV9カプシドのアミノ酸位置474にグルタミンを有するカプシド、または他のAAV型においてこの位置に対応する置換を有するカプシドが提供される。

【0078】

いくつかの実施形態において、カプシドは、AAV8.BBB.LDカプシド(AAV8のアミノ酸配列におけるA269S、498-NNN/AAA-500置換、配列番号66)、AAV9.BBB.LDカプシド(AAV9のアミノ酸配列におけるS263G/S269T/A273T、496-NN/AAA-498置換、配列番号67)、AAV9.496-NNN/AAA-498カプシド(配列番号31)、AAV9.496-NNN/AAA/498.W503Rカプシド(配列番号32)、AAV9.W503Rカプシド(配列番号33)、またはAAV9.Q474Aカプシド(配列番号34)である。他の例において、カプシドは、AAV9.N272A.496-NNN-498カプシド(配列番号91)またはAAV9.G266A.496-NNN-498カプシド(配列番号92)であり得る。

【0079】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のrAAVは、アミノ酸置換を含まないrAAVと比較して、対象(ヒト、非ヒト霊長類、もしくはマウス対象)または細胞培養物における組織特異的(限定されないが、CNSまたは骨格筋及び/または心筋など)細胞形質導入を増加させる。いくつかの実施形態において、組織特異的細胞形質導入の増加は、修飾なしのものよりも少なくとも2倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、または100倍多い。例えば、いくつかの実施形態において、修飾なしの同じAAV型による形質導入と比較して、組織特異的細胞形質導入の50~80倍の増加が存在する。形質導入の増加は、本明細書の実施例に記載され、当該技術分野で知られている方法を使用して評価され得る。

【0080】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のrAAVは、ペプチド挿入を含まないrAAVへの、対象(ヒト、非ヒト霊長類もしくはマウス対象)または細胞培養物における細胞または組織型へのrAAVゲノムの組み込みを増加させる。いくつかの実施形態において、ゲノム組み込みの増加は、修飾なしのカプシド(すなわち、親カプシド)を有するAAVよりも少なくとも2倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、または100倍多い。例えば、いくつかの実施形態において、修飾なしで同じAAV型を有するゲノム組み込みと比較して、ゲノム組み込みが50~80倍増加する。

【0081】

5.2.2 ペプチド挿入を有するrAAVベクター

ペプチド挿入が、CNSまたは心筋もしくは骨格筋への効果的な遺伝子送達を増加させ、親カプシドタンパク質と比較して毒性を低減するために肝臓及び/または後根神経節を非標的化する、1つ以上の(一般に1つまたは2つの)ペプチド挿入を有するカプシドタンパク質を有するrAAVが提供される。特定の実施形態において、ペプチドは、TLAVPFK、TLAAPFK、またはTILSRSTQTG(またはその少なくとも4、5、6、7個のアミノ酸部分)を含む。ペプチドは、例えば、AAV9キャップの138位

、262～273位、452～461位、585～593位の後、特にAAV9の138位、454位、もしくは588位、または本明細書に詳述される別のAAVにおける対応する位置の後に、AAV9カプシドに挿入されてよい。特定の実施形態において、カプシドは、AAV9のG588とA589との間に挿入されたペプチドTLAVPFK（配列番号20）を有し、具体的には、カプシドタンパク質はまた、アミノ酸置換A587D/Q588G（PHP.eB）を有し、さらに、AAV9の138位の後（まとめて、AAVPHPeB.VP2Herp；表17を参照されたい）、または別のAAVの対応する位置に挿入されたペプチドTILSRSTQTG（配列番号15）を有する。追加のカプシドは、カプシド、例えば、AAV9の454と455との間（表17を参照された）、または代替的にまたは代替的にS268とS269との間、もしくはAAV9のQ588とA589との間、または別のAAV血清型の対応する位置に挿入された腎臓1ペプチドLPVASを有する。そのような操作されたカプシドは、心臓及び骨格筋に対する優先的な標的化、ならびに（非操作カプシドを有するAAVと比較して）肝臓及び／または後根神経節細胞に対する低下した標的化を示してもよく、筋疾患（限定されないが、筋ジストロフィーなど）の治療タンパク質をコードする導入遺伝子の送達に特に有用であり得る。

10

20

30

40

【0082】

いくつかの実施形態において、ペプチド挿入は、好ましくはTQTまたはSTQT（配列番号9）モチーフを含む、配列TILSRSTQTG（配列番号15）の少なくとも4、5、6、7、8、9、または10個全ての連続するアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、ペプチド挿入は、好ましくはTQTまたはSTQT（配列番号9）モチーフを含む、配列TILSRSTQTG（配列番号15）の少なくとも4、5、6、7、8、9、または10個全ての連続するアミノ酸からなる。

【0083】

所定の実施形態において、ペプチド挿入は、腎組織を標的とするドメインからの連続するアミノ酸の配列、または当該ドメインの三次元構造を模倣するように設計されたコンフォメーションアナログであってもよい。いくつかの実施形態において、腎臓ホーミングドメインは、配列CLPVASC（配列番号5）を含む（例えば、米国特許第5,622,699号を参照されたい）。いくつかの実施形態において、当該腎臓ホーミングドメインからのペプチド挿入は、配列CLPVASC（配列番号5）からの少なくとも4、5、6、または7つ全てのアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、ペプチド挿入は、配列CLPVASC（配列番号5）を含むか、またはそれからなる。

【0084】

ある特定のホーミングペプチドにおけるシステイン残基の両方が、ペプチドの器官ホーミング活性に有意に影響を与えることなく欠失され得ることが見出されている。例えば、配列LPVAS（配列番号6）を有するペプチドもまた、腎臓ホーミングペプチドであり得る。ペプチドの器官ホーミング活性のためのシステイン残基、またはシステイン残基に対するアミノ酸残基N末端もしくはC末端の必要性を決定するための方法は、ルーチンであり、当該技術分野で周知である。したがって、いくつかの実施形態において、ペプチド挿入は、配列LPVAS（配列番号6）由来の少なくとも4個または5個全てのアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、ペプチド挿入は、配列LPVAS（配列番号6）を含むか、またはそれからなる。

【0085】

特定の実施形態において、ペプチドTLAAPFK（配列番号1）が、AAV9のQ588とA589との間（AAV9.hDyn、表17を参照されたい）、または別のAAVの対応する位置（図7を参照されたい）に挿入されるカプシドを有するrAAVが提供される。そのような操作されたカプシドは、CNSに対する優先的な標的化、ならびに肝臓及び／または後根神経節細胞に対する（非操作カプシドを有するAAVと比較して）低減された標的化を示し得、CNS疾患の処置のための治療タンパク質をコードする導入遺伝子の送達に特に有用であり得る。

【0086】

50

AAV9カプシドVR-IVループ（図2を参照されたい）及び他のAAV型のカプシドのVR-IVループ上の対応する領域内及びその付近のペプチド挿入に適した位置にペプチド挿入を有するカプシドが提供される。以前の研究では、様々なAAVにおける潜在的な位置を分析したが、AAV9 VR-IVがこの目的のために適合可能であることを特定した研究はなかった（例えば、Wu et al., 2000, "Mutational Analysis of the Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2) Capsid Gene and Construction of AAV2 Vectors with Altered Tropism," J. of Virology 74 (18): 8635-8647、Lochrie et al., 2006, "Adeno-associated virus (AAV) capsid genes isolated from rat and mouse liver genomic DNA define two new AAV species distantly related to AAV-5," Virology 353: 68-82、Shi and Bartlett, 2003, "RGD Inclusion in VP3 Provides Adeno-Associated Virus Type 2 (AAV2)-Based Vectors with a Heparan Sulfate-Independent Cell Entry Mechanism," Molecular Therapy 7 (4): 515-525、Nicklin et al., 2001, "Efficient and Selective AAV2-Mediated Gene Transfer Directed to Human Vascular Endothelial Cells" Molecular Therapy 4 (2): 174-181、Grifman et al., 2001, "Incorporation of Tumor-Targeting Peptides into Recombinant Adeno-associated Virus Capsids," Molecular Therapy 3 (6): 964-975、Girod et al., 1999, "Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2," Nature Medicine 3 (9): 1052-1056、Douar et al., 2003, "Deleterious effect of peptide insertions in a permissive site of the AAV2 capsid," Virology 309: 203-208、及びPonnazhagan, et al., 2001, J. of Virology 75 (19): 9493-9501を考慮されたい）。

10

20

30

40

50

【0087】

したがって、これらの点で、特に、カプシドコートの表面露出可変領域内、具体的にはカプシドタンパク質の可変領域IV内またはその付近にペプチド挿入を担持するrAAVベクターが提供される。いくつかの実施形態において、rAAVカプシドタンパク質は、AAV9カプシドタンパク質のアミノ酸451～461のうちの1つに対応するアミノ酸残基（アミノ酸配列配列番号67、及び他のAAV血清型のカプシドタンパク質アミノ酸配列とAAV9カプシドのアミノ酸配列との配置については図7、及び他のカプシド配列については表17を参照されたい）の直後（すなわち、ペプチド結合C末端によって接続された）のペプチド挿入を含み、カプシドタンパク質がAAV粒子としてパッケージされると、当該ペプチド挿入が表面露出する。ペプチド挿入は、AAVカプシドタンパク質のいかなる残基も欠失させてはならない。通常、ペプチド挿入は、他の血清型と比較して、そのカプシドタンパク質の可変（保存性が低い）領域において、及び表面露出ループにおいて起こる。

【0088】

所与の部位「で」挿入されるものとして記載されるペプチド挿入は、野生型ウイルスにおいてその部位で通常見られる残基のカルボキシ基のペプチド結合を有する直後での（

すなわち、そのカルボキシ基に対するペプチド結合を有する）挿入を指す。例えば、AAV9中のQ588での挿入は、ペプチド挿入が、AAV9野生型カプシドタンパク質配列（配列番号67）中のQ588と連続するアミノ酸（A589）との間に現れることを意味する。実施形態において、挿入点においてまたはその近くで（5、10、15残基内または挿入の部位である構造ループ内で）アミノ酸残基の欠失は存在しない。

【0089】

特定の実施形態において、カプシドタンパク質は、AAV9カプシドタンパク質であり、挿入は、アミノ酸残基451～461のうちの少なくとも1つの直後に生じる。特定の実施形態において、ペプチド挿入は、AAV9カプシド（アミノ酸配列番号67）のアミノ酸I451、N452、G453、S454、G455、Q456、N457、Q458、Q459、T460、またはL461の直後に起こる。所定の実施形態において、ペプチドは、AAV9カプシドタンパク質の残基S454とG455との間、またはAAV9カプシドタンパク質（アミノ酸配列番号67）以外のAAVカプシドタンパク質のS454及びG455に対応する残基の間に挿入される。

【0090】

他の実施形態において、AAVカプシドタンパク質に挿入されるカプシドタンパク質に対して異種の標的化ペプチドを含む操作されたカプシドタンパク質が提供され、それによりAAVベクターに組み込まれると、異種ペプチドが表面露出される。

【0091】

他の実施形態において、カプシドタンパク質は、AAV血清型1（AAV1）、血清型2（AAV2）、血清型3（AAV3）、血清型4（AAV4）、血清型5（AAV5）、血清型6（AAV6）、血清型7（AAV7）、血清型8（AAV8）、血清型rh8（AAVrh8）、血清型9e（AAV9e）、血清型rh10（AAVrh10）、血清型rh20（AAVrh20）、血清型rh39（AAVrh39）、血清型hu.37（AAVhu.37）、血清型rh74（AAVrh74、バージョン1及び2）、血清型rh34（AAVrh34）、血清型hu26（AAVhu26）、血清型rh31（AAVrh31）、血清型hu56（AAVhu56）、血清型hu53（AAVhu53）、血清型rh64R1（AAVrh64R1）、血清型rh46（AAVrh46）、ならびに血清型rh73（AAVrh73）（図7または表17を参照されたい）から選択される少なくとも1つのAAV型に由来し、挿入は、アミノ酸残基451～461のうちの少なくとも1つの直後に起こる。これらの異なるAAV血清型の配置は、図7に示されているように、「対応する」アミノ酸残基が、参照配列における残基として配置において同じ位置で並べられるように、異なるカプシドアミノ酸配列における「対応する」アミノ酸残基を示す。いくつかの特定の実施形態において、ペプチド挿入は、図7に示される配列におけるAAV1カプシド（配列番号59）の450～459、AAV2カプシド（配列番号60）の449～458、AAV3カプシド（配列番号61）の449～459、AAV4カプシド（配列番号62）の443～453、AAV5カプシド（配列番号63）の442～445、AAV6カプシド（配列番号64）の450～459、AAV7カプシド（配列番号65）の451～461、AAV8カプシド（配列番号66）の451～461、AAV9カプシド（配列番号67）の451～461、AAV9eカプシド（配列番号68）の452～461、AAVrh10カプシド（配列番号69）の452～461、AAVrh20カプシド（配列番号70）の452～461、AAVhu.37（配列番号71）の452～461、AAVrh74（配列番号72もしくは配列番号80）の452～461、またはAAVrh39（配列番号73）の452～461内のアミノ酸残基のうちの1つの直後に起こる。所定の実施形態において、rAAVカプシドタンパク質は、AAV9カプシドタンパク質のアミノ酸588（すなわち、C末端から）の直後にペプチド挿入（配列番号67のアミノ酸配列を有し、図7を参照）を含み、カプシドタンパク質がAAV粒子としてパッケージングされると、当該ペプチド挿入が表面露出する。他の実施形態において、rAAVカプシドタンパク質は、AAV9のアミノ酸588の直後ではない、またはAAV9のアミノ酸588に対応するものではないペプ

10

20

30

40

50

チド挿入を有する。

【0092】

特定の実施形態において、ペプチドは、AAV1カプシド（配列番号59）の138、262～272、450～459、もしくは585～593；AAV2カプシド（配列番号60）の138、262～272、449～458、もしくは584～592；AAV3カプシド（配列番号61）の138、262～272、449～459、もしくは585～593；AAV4カプシド（配列番号62）の137、256～262、443～453、もしくは583～591；AAV5カプシド（配列番号63）の137、252～262、442～445、もしくは574～582；AAV6カプシド（配列番号64）の138、262～272、450～459、585～593；AAV7カプシド（配列番号65）の138、263～273、451～461、586～594；AAV8カプシド（配列番号66）の138、263～274、452～461、587～595；AAV9カプシド（配列番号67）の138、262～273、452～461、585～593；AAV9eカプシド（配列番号68）の138、262～273、452～461、585～593；AAVrh10カプシド（配列番号69）の138、263～274、452～461、587～595；AAVrh20カプシド（配列番号70）の138、263～274、452～461、587～595；AAVrh74カプシド（配列番号72もしくは配列番号80）の138、263～274、452～461、587～595；AAVhu37カプシド（配列番号71）の138、263～274、452～461、587～595；またはAAVrh39カプシド（配列番号73）の138、263～274、452～461、587～595（図7に番号付けされる）の後に挿入される。

10

20

【0093】

通常、ペプチド挿入物は、異種タンパク質またはそのドメインからの連続アミノ酸の配列である。挿入されるペプチドは、典型的には、それが由来するタンパク質またはドメインの特定の生物学的機能、特性、または特徴を保持するのに十分なほど長い。挿入されるペプチドは、典型的には、挿入物を有さないネイティブカプシドタンパク質と類似してまたは実質的に類似して、カプシドタンパク質がコートを形成することが可能となるように十分に短い。好ましい実施形態において、ペプチド挿入物は、約4～約30アミノ酸残基長、長さが約4～約20、約4～約15、約5～約10、または約7アミノ酸長である。挿入のためのペプチド配列は、少なくとも4アミノ酸長であり、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15アミノ酸長であり得る。いくつかの実施形態において、ペプチド配列は、16、17、18、19、または20アミノ酸長である。実施形態において、ペプチドは、7アミノ酸長以下、10アミノ酸長または12アミノ酸長以下である。

30

【0094】

AAVカプシドタンパク質における「異種タンパク質からのペプチド挿入物」は、カプシドタンパク質に導入されており、かつ任意のAAV血清型カプシドに対してネイティブではないアミノ酸配列を指す。非限定的な例には、AAVカプシドタンパク質におけるヒトタンパク質のペプチドが含まれる。

40

【0095】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載のrAAVは、アミノ酸置換を含まないrAAVと比較して、対象（ヒト、非ヒト霊長類、もしくはマウス対象）または細胞培養物における組織特異的（限定されないが、CNSまたは骨格筋及び／または心筋など）細胞形質導入を増加させる。いくつかの実施形態において、組織特異的細胞形質導入の増加は、ペプチド挿入なしのものよりも少なくとも2倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、または100倍多い。例えば、いくつかの実施形態において、修飾なしの同じAAV型による形質導入と比較して、組織特異的細胞形質導入の50～80倍の増加が存在する。形質導入の増加は、本明細書の実施例に記載され、当該技術分野で知られている方法を使用して評価され得る。

50

【0096】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載の rAAV は、ペプチド挿入を含まない rAAV への、対象（ヒト、非ヒト霊長類もしくはマウス対象）または細胞培養物における細胞または組織型、特に CNS または心筋及び／または骨格筋への rAAV ゲノムの組み込みを増加させる。いくつかの実施形態において、ゲノム組み込みの増加は、ペプチド挿入なしのカプシドを有する AAV よりも少なくとも 2 倍、10 倍、20 倍、30 倍、40 倍、50 倍、60 倍、70 倍、80 倍、90 倍、または 100 倍多い。例えば、いくつかの実施形態において、ペプチド挿入なしで同じ AAV 型を有するゲノム組み込みと比較して、ゲノム組み込みが 50～80 倍増加する。

【0097】

別の態様では、異種ペプチド挿入ライブラリまたは 1 つ以上のアミノ酸置換を有するカプシドのライブラリを含む、カプシドのライブラリが提供される。異種ペプチド挿入ライブラリは、ウイルスカプシド内の異なる挿入部位、例えば、カプシドもしくは異なるバリエーションペプチドの所与の変領域内の異なる位置、またはさらには 1 つ以上のアミノ酸置換において同じペプチド挿入を担持する rAAV ベクターの集合を指す。CNS または心筋及び／または骨格筋組織における形質導入の増強、ならびに肝臓及び／または DRG 細胞における形質導入の低減を含む、組織向性などの改善された特性の増強のために、ライブラリからのカプシドを有する rAAV をスクリーニングする方法が提供される。通常、使用されるカプシドタンパク質は、ウイルスが正常に複製することができる条件下でウイルスの複製を防止するために修飾された rep 及び cap 配列を含有する AAV ゲノムを含む（アデノウイルスなどのヘルパーウイルスとともに哺乳動物細胞の共感染）。次いで、ペプチド挿入ライブラリのメンバーを、rAAV 表面上のペプチドの機能的表示、組織標的化及び／または遺伝子形質導入についてアッセイしてもよい。

【0098】

5.2.3 追加の AAV カプシド挿入部位

以下は、以下に記載される AAV カプシドのアミノ酸残基の直後に、本明細書に記載されるペプチドの挿入部位を要約する（再度、図 7 を参照されたい）：

AAV1：138、262～272、450～459、595～593、及び特定の実施形態において、453～454 の間（配列番号 59）。

AAV2：138、262～272、449～458、584～592、及び特定の実施形態において、452～453 の間（配列番号 60）。

AAV3：138、262～272、449～459、585～593、及び特定の実施形態において、452～453 の間（配列番号 61）。

AAV4：137、256～262、443～453、583～591、及び特定の実施形態において、446～447 の間（配列番号 62）。

AAV5：137、252～262、442～445、574～582、及び特定の実施形態において、445～446 の間（配列番号 63）。

AAV6：138、262～272、450～459、585～593、及び特定の実施形態において、452～453 の間（配列番号 64）。

AAV7：138、263～273、451～461、586～594、及び特定の実施形態において、453～454 の間（配列番号 65）。

AAV8：138、263～274、451～461、587～595、及び特定の実施形態において、453～454 の間（配列番号 66）。

AAV9：138、262～273、452～461、585～593、及び特定の実施形態において、454～455 の間（配列番号 67）。

AAV9e：138、262～273、452～461、585～593、及び特定の実施形態において、454～455 の間（配列番号 68）。

AAVrh10：138、263～274、452～461、587～595 及び特定の実施形態において、454～455 の間（配列番号 69）。

AAVrh20：138、263～274、452～461、587～595、及び特

10

20

30

40

50

定の実施形態において、454～455の間（配列番号70）。

AAVrh39:138、263～274、452～461、587～595、及び特定の実施形態において、454～455の間（配列番号73）。

AAVrh74:138、263～274、452～461、587～595、及び特定の実施形態において、454～455の間（配列番号72または配列番号80）。

AAVhu.37:138、263～274、452～461、587～595、及び特定の実施形態において、454～455の間（配列番号71）

【0099】

特定の実施形態において、ペプチド挿入は、AAV9カプシドのアミノ酸残基588～589の間、またはアミノ酸配列配置によって決定される別のAAV型カプシドの対応する残基の間に起こる（例えば、図7のように）。特定の実施形態において、ペプチド挿入は、AAV9カプシド配列のアミノ酸残基I451～L461、S268、及びQ588の直後、または別のAAVカプシド配列の対応する残基の直後に起こる（図7）。

【0100】

いくつかの実施形態において、1つ以上の挿入は、単一システムにおいて使用され得る。いくつかの実施形態において、カプシドは、対象の免疫系、例えば、対象における既存の抗体の回避によってAAV粒子の認識を減少させるように選択及び／またはさらに修飾され得る。いくつかの実施形態において、いくつかの実施形態において、カプシドは、所望の向性／標的化を向上させるように選択及び／またはさらに修飾され得る。

【0101】

5.2.4 AAVベクター

操作されたカプシドを含むAAVベクターも提供される。いくつかの実施形態において、AAVベクターは、非複製性であり、repまたはcapタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含まない（これらは、rAAVベクターの製造においてパッケージング細胞によって供給される）。いくつかの実施形態において、AAVベースのベクターは、AAVの1つ以上の血清型からの成分を含む。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるAAVベースのベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh39、AAV.Rh74、AAV.RHM4-1、AAV.hu37、AAV.Anc80、AAV.Anc80L65、AAV.7m8、AAV.PHP.B、AAV.PHP.eB、AAV2.5、AAV2tYF、AAV3B、AAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、AAV.HSC16、AAVrh34、AAVhu26、AAVrh31、AAVhu56、AAVhu53、AAVrh64R1、AAVrh46、及びAAVrh73のうちの1つ以上からのカプシド成分、もしくは他のrAAV粒子、またはそれらの2つ以上の組み合わせを含む。

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるAAVベースのベクターは、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh39、AAV.Rh74、AAV.RHM4-1、AAV.hu37、AAV.Anc80、AAV.Anc80L65、AAV.7m8、AAV.PHP.B、AAV.PHP.eB、AAV2.5、AAV2tYF、AAV3B、AAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、もしくはAAV.HSC16、AAVrh34、AAVhu26

、AAVrh31、AAVhu56、AAVhu53、AAVrh64R1、AAVrh46、及びAAVrh73のうちの1つ以上からの成分、または他のrAAV粒子、またはそれらの2つ以上の血清型の組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、例えば、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV.rh8、AAV.rh10、AAV.rh20、AAV.rh39、AAV.Rh74、AAV.RHM4-1、AAV.hu37、AAV.Anc80、rAAV.Anc80L65、AAV.7m8、AAV.PHP.B、AAV.PHP.eB、AAV2.5、AAV2tYF、AAV3B、AAV.LK03、AAV.HSC1、AAV.HSC2、AAV.HSC3、AAV.HSC4、AAV.HSC5、AAV.HSC6、AAV.HSC7、AAV.HSC8、AAV.HSC9、AAV.HSC10、AAV.HSC11、AAV.HSC12、AAV.HSC13、AAV.HSC14、AAV.HSC15、もしくはAAV.HSC16、AAVrh34、AAVhu26、AAVrh31、AAVhu56、AAVhu53、AAVrh64R1、AAVrh46、及びAAVrh73から選択されるAAVカプシド血清型のVP1、VP2及び／またはVP3配列と少なくとも80%以上同一、例えば、85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%等、すなわち、最大で100%同一のカプシドタンパク質、またはその誘導体、修飾、もしくはシュードタイプを含む。これらの操作されたAAVベクターは、治療タンパク質をコードする導入遺伝子を含むゲノムを含み得る。

10

20

【0102】

特定の実施形態において、本明細書における組成物及び方法において使用するための組換えAAVは、Anc80またはAnc80L65である（例えば、Zinn et al., 2015, Cell Rep. 12 (6) : 1056-1068（その全体が参照により組み込まれる）を参照されたい）。特定の実施形態において、本明細書における組成物及び方法において使用するための組換えAAVは、AAV.7m8である（そのバリエーションを含む）（例えば、それらの各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、US9,193,956、US9,458,517、US9,587,282、US2016/0376323、及びWO2018/075798を参照されたい）。特定の実施形態において、本明細書における組成物及び方法において使用するためのAAVは、US9,585,971に開示されている任意のAAV、例えば、AAV-PHP.Bである。特定の実施形態において、本明細書における組成物及び方法において使用するためのAAVは、AAV8及び血清型cy5、rh20またはrh39に由来するハイブリッドカプシド配列を有する、AAV2/Rec2またはAAV2/Rec3ベクターである（例えば、Issa et al., 2013, PLoS One 8 (4) : e60361（これらのベクターについて参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい）。特定の実施形態において、本明細書の組成物及び方法で使用するためのAAVは、以下のいずれかに開示されているAAVであり、それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：US7,282,199、US7,906,111、US8,524,446、US8,999,678、US8,628,966、US8,927,514、US8,734,809、US9,284,357、US9,409,953、US9,169,299、US9,193,956、US9,458,517、US9,587,282、US2015/0374803、US2015/0126588、US2017/0067908、US2013/0224836、US2016/0215024、US2017/0051257、PCT/US2015/034799、及びPCT/EP2015/053335。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、以下の特許及び特許出願にいずれかに開示されるAAVカプシドの、VP1、VP2及び／またはVP3配列に対して少なくとも80%以上同じ、例えば、85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%

30

40

50

、 99%、99.5%など、つまり最大100%同じカプシドタンパク質を有し、それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：米国特許第7,282,199号、同第7,906,111号、同第8,524,446号、同第8,999,678号、同第8,628,966号、同第8,927,514号、同第8,734,809号、同第US9,284,357号、同第9,409,953号、同第9,169,299号、同第9,193,956号、同第9,458,517号、及び同第9,587,282号、米国特許出願公開第2015/0374803号、同第2015/0126588号、同第2017/0067908号、同第2013/0224836号、同第2016/0215024号、同第2017/0051257号、及び国際特許出願第PCT/US2015/034799号、同第PCT/EP2015/053335号。

10

【0103】

いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、米国特許第9,840,719号及びWO2015/013313に開示されている任意のAAVカプシド、例えば、AAV-Rh74及びRHM4-1を含む（それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、AAV rh.74などのWO2014/172669に開示されている任意のAAVカプシド（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を含む。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、Georgiadis et al., 2016, Gene Therapy 23: 857-862及びGeorgiadis et al., 2018, Gene Therapy 25: 450（それらの各々は、その全体が参照により組み込まれる）に記載されている、AAV2/5のカプシドを含む。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、AAV2tYFなどのWO2017/070491に開示されている任意のAAVカプシド（それらはその全体が参照により本明細書に組み込まれる）を含む。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、Puzzo et al., 2017, Sci. Transl. Med. 29(9): 418（その全体が参照により組み込まれる）に記載されている、AAVLK03またはAAV3Bのカプシドを含む。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、米国特許第8,628,966号、US8,927,514、US9,923,120及びWO2016/049230に開示されている任意のAAVカプシド、例えば、HSC1、HSC2、HSC3、HSC4、HSC5、HSC6、HSC7、HSC8、HSC9、HSC10、HSC11、HSC12、HSC13、HSC14、HSC15、またはHSC16（それらの各々は、その全体が参照により組み込まれる）を含む。

20

30

【0104】

いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、国際出願公開第WO2003/052051号（例えば、'051公開の配列番号2を参照されたい）、WO2005/033321（例えば、'321公開の配列番号123及び88を参照されたい）、WO03/042397（例えば、'397公開の配列番号81、85、及び97を参照されたい）、WO2006/068888（例えば、'888公開の配列番号1及び3～6を参照されたい）、WO2006/110689（例えば、'689公開の配列番号5～38を参照されたい）、WO2009/104964（例えば、'964公開の配列番号1、5、7、9、20、22、24及び31を参照されたい）、WO2010/127097（例えば、'097公開の配列番号5～38を参照されたい）、ならびにWO2015/191508（例えば、'508公開の配列番号80～294を参照されたい）、ならびに米国出願公開第2015/0023924号（例えば、'924公開の配列番号1、5～10を参照されたい）（それらの各々の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているカプシドタンパク質を有する。いくつかの実施形態において、rAAV粒子は、国際出願公開第WO2003/052051号（例えば、'051公開の配列番号2を参照されたい）、WO2005/033321（例えば、'321公開の配列番号123及び88を参照されたい）、WO03/042397（例えば、'397公開の配列番号2、81、85及び97を参照されたい）、WO2006/068888（

40

50

例えば、' 888 公開の配列番号 1 及び 3～6 を参照されたい)、WO 2006 / 110 689 (例えば、' 689 公開の配列番号 5～38 を参照されたい)、WO 2009 / 104964 (例えば、964 公開の配列番号 1～5、7、9、20、22、24 及び 31 を参照されたい)、WO 2010 / 127097 (例えば、' 097 公開の配列番号 5～38 を参照されたい)、ならびに WO 2015 / 191508 (例えば、' 508 公開の配列番号 80～294 を参照されたい)、ならびに米国出願公開第 2015002392 4 号 (例えば、' 924 公開の配列番号 1、5～10 を参照されたい) に開示されている AAV カプシドの VP1、VP2 及び / または VP3 配列と少なくとも 80% 以上同一、例えば、85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 等、すなわち、最大で 100% 同一のカプシドタンパク質を有する。

10

【0105】

追加の実施形態において、rAAV 粒子は、シュードタイプ化 AAV カプシドを含む。いくつかの実施形態において、シュードタイプ化 AAV カプシドは、rAAV2 / 8 または rAAV2 / 9 シュードタイプ化 AAV カプシドである。シュードタイプ化 rAAV 粒子を生成及び使用する方法は、当該技術分野において既知である (例えば、Duan et al., J. Virol., 75:7662-7671 (2001)、Halber et al., J. Virol., 74:1524-1532 (2000)、Zolotukhin et al., Methods 28:158-167 (2002)、及び Auricchio et al., Hum. Molec. Genet. 10:3075-3081, (2001) を参照されたい)。

20

【0106】

所定の実施形態において、一本鎖 AAV (ssAAV) が使用され得る。所定の実施形態において、自己相補的ベクター、例えば、scAAV を使用してもよい (例えば、Wu, 2007, Human Gene Therapy, 18 (2):171-82、McCarty et al., 2001, Gene Therapy, 8 (16):1248-1254、US 6,596,535、US 7,125,717、及び US 7,456,683 を参照されたい (その各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。

【0107】

5.3. rAAV 粒子を作製する方法

本発明の別の態様は、本明細書に開示されるカプシドを有する rAAV 粒子を作製することを含む。いくつかの実施形態において、rAAV 粒子は、本明細書に記載のカプシドタンパク質のうちのいずれかをコードする核酸配列を含むヌクレオチドを提供すること、及びカプシドタンパク質から構成されるカプシドコートに有する対応する rAAV 粒子を調製するためのパッケージング細胞システムを使用することによって作製される。いくつかの実施形態において、核酸配列は、本明細書に記載のカプシドタンパク質分子の配列に対して少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 99.9% の同一性を有する配列をコードし、カプシドタンパク質の生物学的機能を保持する (または実質的に保持する)。いくつかの実施形態において、核酸は、カプシドタンパク質の生物学的機能を保持 (または実質的に保持) しながら、本明細書に記載のカプシドタンパク質、例えば、表 17 の配列を有するもの、または本明細書に記載の他のもの (図 7 も参照されたい) のうちの 1 つの配列に対して少なくとも 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% または 99.9% の同一性を有する配列をコードする。

30

40

【0108】

カプシドタンパク質、コート、及び rAAV 粒子は、当該技術分野で知られている技術によって生成され得る。いくつかの実施形態において、ウイルスゲノムは、ベクターへのパッケージングを許容するための少なくとも 1 つの末端逆位配列を含む。いくつかの実施形態において、ウイルスゲノムは、cap 遺伝子及び / または cap 遺伝子の発現及びスプ

50

ライシングのための *rep* 遺伝子をさらに含む。他の実施形態において、*cap* 及び *rep* 遺伝子は、パッケージング細胞によって提供され、ウイルスゲノムには存在しない。

【0109】

いくつかの実施形態において、操作されたカプシドタンパク質をコードする核酸は、既存のカプシド遺伝子の代わりに *AAV Rep-Cap* ヘルパープラスミドにクローニングされる。宿主細胞と一緒に導入される場合、このプラスミドは、*rAAV* ゲノムを、カプシドコートとしての操作されたカプシドタンパク質にパッケージングすることを補助する。パッケージング細胞は、*AAV* ゲノム複製、カプシド組み立て、及びパッケージングを促進するのに必要な遺伝子を保有する任意の細胞タイプであり得る。非限定的な例としては、293細胞またはその誘導体、HELA細胞、または昆虫細胞が挙げられる。

10

【0110】

標準的な技術が、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、及び組織培養及び形質転換（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション）に使用され得る。酵素反応及び精製技術は、製造業者の仕様に従って、または当該技術分野で一般的に達成されるように、または本明細書に記載されるように実行され得る。前述の技術及び手順は、一般に、当該技術分野で周知の従来の方法に従って、及び本明細書全体で引用及び論じられている様々な一般的かつより具体的な参考文献に記載されているように、実行することができる。例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))（あらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。具体的な定義が提供されない限り、本明細書に記載の分析化学、合成有機化学、及び医薬的及び薬学的化学に関連して利用される命名法、ならびに実験室の手順及び技術は、当該技術分野でよく知られ、一般的に使用されるものである。標準的な技術は、化学合成、化学分析、薬学的調製、製剤、及び患者の送達、及び治療に使用できる。*AAV* ベースのウイルスベクターの核酸配列、及び組換え *AAV* 及び *AAV* カプシドを作製する方法は、例えば、US 7, 282, 199、US 7, 790, 449、US 8, 318, 480、US 8, 962, 332 及び PCT/EP 2014/076466（それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）で教示されている。

20

【0111】

いくつかの実施形態において、*rAAV* は、以下により詳細に論述されるように、治療及び予防用途において使用され得る導入遺伝子送達ベクターを提供する。いくつかの実施形態において、*rAAV* ベクターはまた、対象の標的細胞内で核酸（導入遺伝子）によってコードされるRNA及び／またはタンパク質生成物の発現に影響を及ぼすことが当業者に知られている制御性調節要素を含む。制御性調節要素は、組織特異的、すなわち、標的細胞／組織においてのみ活性（または実質的により活性または有意により活性）であり得る。特定の実施形態において、*AAV* ベクターは、制御性配列、例えば、標的組織における発現を可能にする、導入遺伝子に機能可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、構成的プロモーター、例えば、CB7プロモーターであり得る。追加のプロモーターとしては、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、ラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーター、MMTプロモーター、EF-1アルファプロモーター、UB6プロモーター、ニワトリベーターアクチンプロモーター、CAGプロモーター、RPE65プロモーター、オプシンプロモーター、TBG（サイロキシン結合グロブリン）プロモーター、APOA2プロモーター、SERPINA1（hAAT）プロモーター、またはMIR122プロモーターが挙げられる。いくつかの実施形態において、特に、導入遺伝子発現をオフにすることが望ましい場合には、誘導性プロモーター、例えば、低酸素誘導性またはラパマイシン誘導性プロモーターが使用される。

30

40

【0112】

特定の実施形態において、調節要素の制御下で、ITR及び本明細書に記載される操作されたウイルスカプシドに隣接する、または操作されたカプシドの生物学的機能を保持し

50

ながら、本明細書に記載されるカプシドタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、99%もしくは99.9%同一である（例えば、表17を参照されたい）、導入遺伝子の発現のための発現カセットを含むウイルスゲノムを含むAAVベクターが提供される。所定の実施形態において、コードされた操作されたカプシドは、AAV8.BBB.LDカプシド（配列番号27）、AAV9.BBB.LDカプシド（配列番号29）、AAV9.496-NNN/AAA-498カプシド（配列番号31）、AAV9.496-NNN/AAA-498カプシド（配列番号32）、AAV9.W503Rカプシド（配列番号33）、AAV9.Q474Aカプシド（配列番号34）、AAV9.N272A.496-NNN/AAA-498カプシド（配列番号91）またはAAV9.N266A.496-NNN/AAA-498カプシド（配列番号92）の配列を有する。また、操作されたAAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9e、AAVrh10、AAVrh20、AAVhu.37、AAVrh39、AAVrh74、AAVrh34、AAVhu26、AAVrh31、AAVhu56、AAVhu53、AAVrh.46、AAVrh.64.R1、AAV.rh.73ベクターなどの、AAV9ベクター以外の操作されたAAVベクターも提供され、本明細書に記載のアミノ酸置換及び／またはペプチド挿入物、ならびにそのAAV型の野生型もしくは非操作配列と比較して1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、もしくは30個のアミノ酸置換を有し、かつその生物学的機能を保持するものを含む。

10

20

【0113】

組換えアデノウイルスは、E1欠失を有し、E3欠失を有しまたは有さず、いずれかの欠失領域に挿入された発現カセットを有する第一世代ベクターであり得る。組換えアデノウイルスは、E2及びE4領域の完全または部分欠失を含有する第二世代ベクターであり得る。ヘルパー依存性アデノウイルスは、アデノウイルス末端逆位反復及びパッケージングシグナル（phi）のみを保持する。導入遺伝子は、通常、パッケージングシグナルと3' ITRとの間に挿入され、およそ36kbの野生型サイズに近いゲノムを維持するためにstuffer配列を伴うか、または伴わない。アデノウイルスベクターの生成のための例示的なプロトコルは、Alba et al., 2005, "Gutless adenovirus: last generation adenovirus for gene therapy," Gene Therapy 12: S18-S27（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）に見出される。

30

【0114】

導入遺伝子を標的組織、細胞、または器官に送達するためのrAAVベクターは、その特定の標的組織、細胞、または器官に対する向性を有する。組織特異的プロモーターも使用され得る。コンストラクトは、ベクターによって駆動される導入遺伝子の発現を増強する発現制御要素（例えば、イントロン、例えば、ニワトリβ-アクチンイントロン、マウス微小ウイルス（MVM）イントロン、ヒト第IX因子イントロン（例えば、FIX切断イントロン1）、β-グロブリンスプライスドナー／免疫グロブリン重鎖スプライス受容体イントロン、アデノウイルススプライスドナー／免疫グロブリンスプライス受容体イントロン、SV40後期スプライスドナー／スプライスアクセプター（19S/16S）イントロン、及びハイブリッドアデノウイルススプライスドナー／IgGスプライス受容体イントロン及びポリAシグナル、例えば、ウサギβ-グロブリンポリAシグナル、ヒト成長ホルモン（hGH）ポリAシグナル、SV40後期ポリAシグナル、合成ポリA（SPA）シグナル、及びウシ成長ホルモン（bGH）ポリAシグナルをさらに含み得る。例えば、Powell and Rivera-Soto, 2015, Discov. Med., 19(102): 49-57を参照されたい。

40

【0115】

所定の実施形態において、本明細書に開示される核酸配列は、例えば、当業者に知られている任意のコドン最適化技術を介してコドン最適化され得る（例えば、Quax et

50

a l. , 2015, Mol Cell 59:149-161による概説を参照されたい)。

【0116】

特定の実施形態において、本明細書に記載のコンストラクトは、以下の構成要素を含む：(1) 発現カセットに隣接するAAV2逆位末端反復、(2) a) CNS及び／または筋肉細胞内での導入遺伝子の発現を促進するためのプロモーター、及び任意選択で、エンハンサー要素、b) 任意選択で、イントロン配列、例えば、ニワトリβ-アクチンイントロン、及びc) ポリアデニル化配列、例えば、SV40ポリAまたはウサギβ-グロビンポリAシングル、ならびに(3) 目的の核酸またはタンパク質産物を提供する(例えば、コードする)導入遺伝子を含む、制御要素。

10

【0117】

本明細書で提供されるウイルスベクターは、宿主細胞、例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、ウサギ、またはハムスターからの宿主細胞を含む哺乳動物宿主細胞を使用して製造され得る。非限定的な例は、以下を含む：A549、WEHI、10T1/2、BHK、MDCK、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10、VERO、W138、HeLa、293、Saos、C2C12、L、HT1080、HepG2、一次線維芽細胞、肝細胞、及び筋芽細胞。典型的には、宿主細胞は、導入遺伝子及び関連要素(すなわち、ベクターゲノム)をコードする配列、及び宿主細胞内でウイルスを産生するための遺伝子成分、例えば、複製及びカプシド遺伝子(例えば、AAVのrep及びcap遺伝子)によって安定して形質転換される。AAV8カプシドを有する組換えAAVベクターの製造方法については、その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,282,199B2号の詳細な説明のセクションIVを参照されたい。当該ベクターのゲノムコピー力価は、例えば、TAQMAN(登録商標)分析によって決定され得る。ビリオンは、例えば、CsCl₂沈降によって回収され得る。代替的に、昆虫細胞内のバキュロウイルス発現系を使用して、AAVベクターを生成し得る。概説については、Aponte-Ubillus et al., 2018, Appl. Microbiol. Biotechnol. 102:1045-1054(製造技術について、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

20

【0118】

インビトロアッセイ、例えば、細胞培養アッセイは、本明細書に記載されるベクターからの導入遺伝子発現を測定するために使用され得、したがって、例えば、ベクターの効力を示す。例えば、PER.C6(登録商標)細胞株(Lonza)、ヒト胚網膜細胞に由来する細胞株、または網膜色素上皮細胞、例えば、網膜色素上皮細胞株hTERT RPE-1(ATCC(登録商標)から利用可能である)が、導入遺伝子発現を評価するために使用され得る。代替的には、肝臓または他の細胞タイプに由来する細胞株、例えば、限定されないが、HuH-7、HEK293、線維肉腫HT-1080、HKB-11、及びCAP細胞が使用され得る。発現すると、当該技術分野で知られているアッセイを使用して、グリコシル化及びチロシン硫酸化パターンの決定を含む、発現した生成物(すなわち、導入遺伝子産物)の特性が決定され得る。

30

【0119】

5.4. 治療的及び予防的使用

別の態様は、疾患または障害を遅延、予防、治療、及び／または管理するための、本発明によるrAAVベクターを介した導入遺伝子を、それを必要とする対象に投与すること、及び／またはそれに関連する1つ以上の症状を改善することを伴う治療法に関する。それを必要とする対象は、疾患もしくは障害に罹患している対象、またはその素因がある対象、例えば、疾患もしくは障害の発症または再発のリスクがある対象を含む。一般に、特定の導入遺伝子を保有するrAAVは、導入遺伝子に対応する対象の天然遺伝子が、正しい遺伝子産物、または正しい量の遺伝子産物を提供することに欠陥がある対象において、所与の疾患または障害に関して使用されることになる。次いで、導入遺伝子は、対象において欠陥のある遺伝子のコピーを提供することができる。

40

50

【0120】

一般に、導入遺伝子は、対応するネイティブ遺伝子内の遺伝子変異（複数可）を有する対象にタンパク質機能を復元するcDNAを含む。いくつかの実施形態において、cDNAは、相同組換えを介したゲノム編集などのゲノム工学を実行するための関連RNAを含む。いくつかの実施形態において、導入遺伝子は、治療用RNA、例えば、shRNA、人工miRNA、またはスプライシングに影響を及ぼす要素をコードする。

【0121】

以下の表1A～1Bは、本明細書に記載のrAAVベクターのうちのいずれか、具体的には、本明細書に記載の新規挿入部位において、導入遺伝子が関連する疾患（これも表1A～1Bに列挙される）を処置または予防するために使用され得る導入遺伝子のリストを提供する。本明細書に記載されるように、AAVベクターは、導入遺伝子の送達のための適切な組織を標的として治療的または予防的使用を達成するように、本明細書に記載されるように操作され得る。適切なAAV血清型は、ベクターの組織傾向性及び形質導入を最適化するように操作するために選択され得る。

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1 A

疾患	導入遺伝子	導入遺伝子の 送達のための 可能性のある AAV 血清型
MPS I	アルファ-L-イズロニダーゼ (IDUA)	AAV9
MPS II (ハンター症候群)	イズロン酸-2-スルファターゼ (IDS)	AAV9
セロイドリポフスチン症 (バッテン病)	(CLN1、CLN2、CLN10、CLN13)、可溶性リソ ソームタンパク質 (CLN5)、分泌経路内のタン パク質 (CLN11)、末梢的に膜と会合する 2 つ の細胞質タンパク質 (CLN4、CLN14)、及び異 なる細胞内位置を有する多くの膜貫通タンパク 質 (CLN3、CLN6、CLN7、CLN8、CLN12)	AAV9
MPS IIIa (サンフィリポ A 型 症候群)	ヘパラン硫酸スルファターゼ (N-スルホグルコ サミンスルホヒドロラーゼ (SGSH)とも呼ばれ る)	AAV9、Rh10
MPS IIIB (サンフィリポ B 型症候群)	N-アセチル-アルファ-D-グルコサミニダーゼ (NAGLU)	AAV9
MPS VI (マロトー・ラミー 症候群)	アリアルスルファターゼ B	AAV8
モルキオ症候群 (MPS IV)	ベータガラクトシダーゼまたはガラクトサミン -6-スルファターゼ	AAV9
ゴーシェ病 (I 型、II 型、III 型)	グルコセレブロシダーゼ GBA1	AAV9
パーキンソン病	グルコセレブロシダーゼ、GBA1	AAV9
パーキンソン病	ドーパミンデカルボキシラーゼ	AAV2
ポンペ	酸性マルターゼ、GAA	AAV9
異染性白質ジストロフィー	アリアルスルファターゼ A	Rh10
MPS VII (スライ症候群)	ベータ-グルクロニダーゼ	
MPS VIII	グルコサミン-6-硫酸スルファターゼ	
MPS IX	ヒアルロニダーゼ	
ニーマン・ピック病	スフィンゴミエリナーゼ	
スフィンゴミエリナーゼ欠 損症のないニーマン・ピッ ク病	コレステロール代謝酵素をコードする npc1 遺 伝子	
テイ・サックス病	ベータ-ヘキソサミニダーゼのアルファサブユ ニット	

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

疾患	導入遺伝子	導入遺伝子の送達のための可能性のある AAV 血清型
サンドホフ病	ベータヘキソサミニダーゼのアルファ 及びベータサブユニットの両方	
ファブリー病	アルファ-ガラクトシダーゼ	
フコシドーシス	フコシダーゼ (FUCA1 遺伝子)	
アルファ-マンノシドーシス	アルファ-マンノシダーゼ	
ベータ-マンノシドーシス	ベータ-マンノシダーゼ	
ウォルマン病	コレステロールエステルヒドラーゼ	
パーキンソン病	ニューロツリン	
パーキンソン病	グリア由来成長因子 (GDGF)	
パーキンソン病	チロシンヒドロキシラーゼ	
パーキンソン病	グルタミン酸デカルボキシラーゼ	
疾患が記載されていない	線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2)	
疾患が記載されていない	脳由来成長因子 (BDGF)	
疾患が記載されていない (ガラクトシアリドーシス (ゴールドバーク症候群))	ベータガラクトシダーゼを有するノイ ラミニダーゼ欠損症 欠損症	
脊髄性筋萎縮症 (SMA)	SMN	AAV9
フリードライヒ運動失調症	フラタキシン	AAV9 PHP.B
筋萎縮性側索硬化症 (ALS)	SOD1	Rh10
グリコーゲン貯蔵病 1a	グルコース-6-ホスファターゼ	AAV8
XLMTM	MTM1	AAV8 または AAV9
クリグラー・ナジャール	UGT1A1	AAV8
CPVT	CASQ2	AAV9
レット症候群	MECP2	AAV9
色覚異常	CNGB3、CNGA3、GNAT2、PDE6C	AAV8
コロイデレミア	CDM	AAV8
ダノン病	LAMP2	AAV9

10

20

30

40

50

【表 2 - 1】

表 1 B

疾患	導入遺伝子	導入遺伝子の送達のための可能性のある AAV 血清型
嚢胞性線維症	CFTR	AAV2
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	ミニジストロフィンまたはマイクロジストロフィン遺伝子	AAV2、AAV8 または AAV9
肢帯型筋ジストロフィー2C 型 ガンマサルコグリカン異常症	ヒト-アルファ-サルコグリカン	AAV1
進行性心不全	SERCA2a	AAV6
関節リウマチ	TNFR: Fc 融合遺伝子	AAV2
レーバー先天性黒内障	GAA	AAV1
肢帯型筋ジストロフィー2C 型 ガンマサルコグリカン異常症	ガンマ-サルコグリカン	AAV1
網膜色素変性	hMERTK	AAV2
加齢黄斑変性	sFLT01	AAV2
ベッカー型筋ジストロフィー及び散発性封入体筋炎	huFollistatin344	AAV1
パーキンソン病	GDNF	AAV2
異染性白質ジストロフィー (MLD)	cuARSA	AAVrh.10
C 型肝炎	抗 HCV shRNA	AAV8
肢帯型筋ジストロフィー2D 型	hSGCA	AAVrh74*
ヒト免疫不全ウイルス感染症、HIV 感染症 (HIV-1)	PG9DP	AAV1
急性間欠性ポルフィリン症	PBGD	AAV5
レーバー遺伝性視神経症	P1ND4v2	AAV2
アルファ-1 アンチトリプシン欠乏症	アルファ 1AT	AAVrh10
ポンペ病	hGAA	AAV9
X 連鎖網膜分離症	RS1	AAV8
コロイデレミア	hCHM	AAV2
巨大軸索性ニューロパチー	JeT-GAN	AAV9
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	rmicro ジストロフィン	AAVrh74*
X 連鎖網膜分離症	hRS1	AAV2
扁平上皮細胞頭頸部癌、放射線誘発性口腔乾燥症	hAQP1	AAV2
血友病 B	第 IX 因子	AAVrh10/Rh74
ホモ接合型 FH	hLDLR	AAV8

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

疾患	導入遺伝子	導入遺伝子の送達のための可能性のある AAV 血清型
ジスフェルリン異常症	rAAVrh74.MHCK7.DYSF.DV	AAVrh74
血友病 B	AAV6 ZFP スクレアーゼ	AAV6
MPS I	AAV6 ZFP スクレアーゼ	AAV6
関節リウマチ	NF-kB, IFN- β	AAV5
バッテン/CLN6	CLN6	AAV9
サンフィリポ病 A 型	hSGSH	AAV9
変形性関節症	5IL-1Ra	AAV2.5
色覚異常	CNGA3	AAV2tYF
色覚異常	CNGB3	AAV8
オルニチントランスカルバミラーゼ (OTC) 欠損症	OTC	scAAV8
血友病 A	第 VIII 因子	LK03/AAV3B
ムコ多糖症 II	ZFP スクレアーゼ	AAV6
血友病 A	ZFP スクレアーゼ	AAV6
浸出型 AMD	抗 VEGF	AAV8
X 連鎖性網膜色素変性	PGR	AAV2
ムコ多糖症 VI 型	hARSB	AAV8
レーバー遺伝性視神経症	ND4	AAV2
X 連鎖性ミオチューブラーミオパチー	MTM1	AAV8
クリグラー・ナジャール症候群	UGT1A1	AAV8
色覚異常	CNGB3	AAV8
網膜色素変性	hPDE6B	AAV5
X 連鎖性網膜色素変性	RPGR	AAV2tYF
ムコ多糖症 3B 型	hNAGLU	AAV9
デュシェンヌ型筋ジストロフィー	GALGT2	AAVrh74
関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎	TNFR:Fc 融合遺伝子	AAV2
特発性パーキンソン病	ニューロツリン	AAV2
アルツハイマー病	NGF	AAV2
ヒト免疫不全ウイルス感染症、HIV 感染症 (HIV-1)	tgAAC09	AAV2
家族性リポタンパク質リパーゼ欠乏症	LPL	AAV1
特発性パーキンソン病	ニューロツリン	AAV2
アルファ-1 アンチトリプシン欠乏症	hAAT	AAV1

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

疾患	導入遺伝子	導入遺伝子の送達のための可能性のある AAV 血清型
レーバー先天性黒内障 (LCA) 2	hRPE65v2	AAV2
バッテン病、遅発型小児性神経リポフスチン症	CLN2	AAVrh.10
パーキンソン病	GAD	AAV2
サンフィリポ病 A 型/ムコ多糖症 IIIA 型	N-スルホグルコサミンスルホヒドロラーゼ (SGSH) 遺伝子	AAVrh.10
うっ血性心不全	SERC2a	AAV1
ベッカー型筋ジストロフィー及び散発性封入体筋炎	rAAV1.CMV.huFollistatin344	AAV1
パーキンソン病	hAADC-2	AAV2
コロイデレミア	REP1	AAV2
ステージ IV 胃癌における CEA 特異的 AAV-DC-CTL 処置	CEA	AAV2
胃癌	MUC1-ペプチド-DC-CTL	
レーバー遺伝性視神経症	scAAV2-P1ND4v2	scAAV2
芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ欠損症	hAADC	AAV2
血友病 B	第 IX 因子	AAVrh10
パーキンソン病	AADC	AAV2
レーバー遺伝性視神経症	遺伝子: GS010 薬物: プラセボ	AAV2
SMA-脊髄性筋萎縮症 遺伝子療法	SMN	AAV9
血友病 A	B-ドメイン欠失第 VIII 因子	AAV8
MPS I	IDUA	AAV9
MPS II	IDS	AAV9
CLN3 関連ニューロンセロイドリポフスチン症 (バッテン)	CLN3	AAV9
肢帯型筋ジストロフィー、2E 型	hSGCB	rh74
アルツハイマー病	APOE2	rh10
網膜色素変性	hMERKTK	AAV2
網膜色素変性	RLBP1	AAV8
浸出型 AMD	抗 VEGF 抗体	AAV2.7m8

【0122】

例えば、グリア由来成長因子 (G D G F) をコードする導入遺伝子を含む r A A V ベクターは、パーキンソン病を処置／予防／管理する用途を見出す。一般に、r A A V ベクターは、全身投与される。例えば、r A A V ベクターは、静脈内、くも膜下腔内、鼻腔内、及び／または腹腔内投与によって提供され得る。

【0123】

所定の実施形態において、導入遺伝子は、マイクロジストロフィン (例えば、W O 2 0 2 1 / 1 0 8 7 5 5、W O 2 0 0 2 / 0 2 9 0 5 6、W O 2 0 1 6 / 1 1 5 5 4 3、W O 2 0 1 5 / 1 9 7 2 3 2、W O 2 0 1 6 / 1 7 7 9 1 1、U S 7 8 9 2 8 2 4 B 2、U S

9624282B2、及びWO2017221145に開示されるように、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる)をコードし、筋ジストロフィーなどのジストロフィン異常症の処置に有用である。本明細書の実施例18は、mdxマウス(筋ジストロフィーのための動物モデル)と比較して、野生型マウスへの静脈内投与後のカプシドAAV7、AAV8、AAV9、AAVrh.10、AAVrh.46、AAVrh.64.R1、及びAAVrh.73の相対的存在量を示す。これらのカプシド、またはそれらの操作形態を有するrAAV粒子は、デュシェンヌ型筋ジストロフィーなどの筋ジストロフィーの処置のために、肝臓細胞への送達を低減している一方で、骨格筋及び／または心筋を含む筋肉細胞への、ミクロジストロフィンまたは他のジストロフィン異常症治療タンパク質をコードする導入遺伝子の送達に有用であり得る。

10

【0124】

特定の態様において、本発明のrAAVは、処置／予防される障害または疾患に関連する、標的組織、または標的細胞タイプに関連する細胞マトリックスを含む、標的細胞タイプへの送達における使用を見出す。特定の組織または細胞タイプに関連する疾患または障害は、身体の他の細胞タイプの組織と比較して、特定の組織または細胞タイプに大きな影響を及ぼすもの、または障害の作用または症状が特定の組織または細胞タイプで現れるものである。導入遺伝子を、それを必要とする対象の標的組織に送達する方法は、ペプチド挿入がホーミングペプチドである、tan rAAVを対象に投与することを含む。例えば、パーキンソン病の場合、rAAVを神経組織に指向するペプチド挿入を含むrAAVベクターを使用することができ、具体的には、ペプチド挿入は、rAAVがCNSへの血液脳関門を通過することを容易にする。

20

【0125】

神経組織に関連する疾患または障害の場合、本明細書に記載の任意のものなどの神経組織ホーミングドメインからのペプチド挿入を含む、rAAVベクターを使用することができる。神経組織に関連する疾患／障害には、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、バッテン病、バッテン病の若年性NCL形態、カナバン病、慢性疼痛、フリードライヒ運動失調症、多形性膠芽腫、ハンチントン病、遅発性小児性神経セロイドリポフスチン症(LINCL)、リソソーム貯蔵障害、レーバー先天性黒内障、多発性硬化症、パーキンソン病、ポンベ病、レット症候群、脊髄損傷、脊髄性筋萎縮症(SMA)、脳卒中、及び外傷性脳損傷が含まれる。ベクターはさらに、疾患または障害に罹患しているか、またはその発症のリスクがある対象に対する治療的／予防的利益のための導入遺伝子を含有することができる(表1A~1Bを参照されたい)。

30

【0126】

本発明のrAAVベクターはまた、オリゴヌクレオチド、薬物、造影剤、無機ナノ粒子、リポソーム、抗体の標的細胞または組織への送達、具体的には標的化送達を容易化し得る。rAAVベクターはまた、非コードDNA、RNA、またはオリゴヌクレオチドの標的組織への送達、具体的には標的化送達を容易化し得る。

【0127】

薬剤は、当該技術分野で知られている及び／または本明細書に記載されている薬学的に許容可能な組成物として提供され得る。また、本発明のrAAV分子は、単独でまたは他の予防及び／または治療剤と組み合わせて投与され得る。

40

【0128】

本明細書で提供される投与の投薬量及び頻度は、治療的に有効及び予防的に有効という用語に包含される。投薬量及び頻度は、典型的には、投与される特定の治療薬または予防薬、疾患の重症度及びタイプ、投与経路、ならびに患者の年齢、体重、応答、及び過去の病歴に応じて、各患者に特有の要因に従って変化し、開業医の判断及び各患者の状況に従って決定されるべきである。好適なレジメンは、そのような要因を考慮し、例えば、文献に報告され、Physician's Desk Reference(56th ed., 2002)に推奨されている投薬量に従うことによって選択され得る。予防剤及び／または治療剤は、繰り返し投与され得る。手順のいくつかの態様は、予防剤または治療剤を

50

投与する時間的レジメン、ならびにそのような薬剤が別々にまたは混合物として投与されるかどうかなど、変化し得る。

【0129】

有効であろう本発明の薬剤の量は、標準的な臨床技術によって決定することができる。有効用量は、インビトロまたは動物モデル試験系に由来する用量応答曲線から外挿され得る。本発明の方法で使用される任意の薬剤について、治療有効用量は、最初は、細胞培養アッセイから推定され得る。用量は、細胞培養で決定される IC_{50} （すなわち、症状の半数阻害を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成するために、動物モデルで定式化されてもよい。そのような情報は、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定するために使用され得る。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィー

10

【0130】

予防及び／または治療剤、ならびにそれらの組み合わせは、ヒトにおいて使用する前に、好適な動物モデル系において試験され得る。そのような動物モデル系には、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ブタ、イヌ、ウサギ等が含まれるが、これらに限定されない。当該技術分野において周知の任意の動物系を使用することができる。そのようなモデル系は、広く使用されており、当業者によく知られている。いくつかの実施形態において、ラット、マウス、または霊長類以外の他の小型哺乳動物に基づくCNS状態のための動物モデル系が使用される。

【0131】

本発明の予防及び／または治療剤が動物モデルにおいて試験されると、それらは、それらの有効性を確立するために臨床試験において試験され得る。臨床試験の確立は、当業者に知られている一般的な方法論に従って行われ、本発明の薬剤の最適な投薬量及び投与経路ならびに毒性プロファイルを確立することができる。例えば、臨床試験は、ヒト患者における有効性及び毒性について本発明のrAAV分子を試験するように設計され得る。

20

【0132】

本発明の予防及び／または治療剤の毒性及び有効性は、例えば、 LD_{50} （集団の50%に致死的な用量）及び ED_{50} （集団の50%に治療的に有効な用量）を決定するための、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定され得る。毒性効果と治療効果との間の用量比は治療指数であり、 LD_{50}/ED_{50} の比で表すことができる。大きな治療指標を示す予防及び／または治療剤が好ましい。毒性副作用を示す予防及び／または治療剤が使用され得るが、未感染細胞への潜在的な損傷を最小限に抑え、それによって副作用を低減するために、そのような薬剤を罹患組織の部位に標的とする送達システムを設計するように注意されるべきである。

30

【0133】

本発明のrAAV分子は、一般に、所望の治療的及び／または予防的利益を得るのに有効な時間及び量で投与される。細胞培養アッセイ及び動物研究から得られるデータは、ヒトにおいて使用するための予防及び／または治療剤の投薬量のための範囲及び／またはスケジュールを定式化する際に使用され得る。そのような薬剤の投薬量は、毒性がほとんどまたは全くない ED_{50} を含む循環濃度の範囲内に入る。投薬量は、用いられる剤形及び利用される投与経路に応じてこの範囲内で変わり得る。

40

【0134】

患者に対するrAAVベクターの治療上有効な投薬量は、一般に、約 1×10^9 ～約 1×10^{16} ゲノムrAAVベクター、または約 1×10^{10} ～約 1×10^{15} 、約 1×10^{12} ～約 1×10^{16} 、または約 1×10^{14} ～約 1×10^{16} AAVゲノムの濃度を含有する、約0.1ml～約100mlの溶液である。導入遺伝子の発現レベルをモニタリングして、投与量、頻度、スケジュールリングなどを決定／調整することができる。

【0135】

治療的または予防的有効量の本発明の薬剤による対象の治療は、単一の治療を含み得るか、または一連の治療を含み得る。例えば、本発明の薬剤を含む薬学的組成物は、1回投

50

与され得るか、または2回、3回もしくは4回以上のシリーズで、例えば、その用量のシリーズが投与されるまで、週1回、月1回もしくは2ヶ月ごと、3ヶ月、6ヶ月または1年投与され得る。

【0136】

また、本発明のrAAV分子は、単独でまたは他の予防及び／または治療剤と組み合わせて投与され得る。各予防または治療剤は、同じ時間または異なる時点で任意の順序で順次に投与され得る。しかしながら、同じ時間に投与されない場合、それらは、所望の治療的または予防的効果を提供するように、十分に近い時間で投与されるべきである。各治療剤は、任意の適切な形態で及び任意の好適な経路によって別々に投与され得る。

【0137】

様々な実施形態において、異なる予防及び／または治療剤は、1時間未満の間隔で、約1時間の間隔で、約1時間～約2時間の間隔で、約2時間～約3時間の間隔で、約3時間～約4時間の間隔で、約4時間～約5時間の間隔で、約5時間～約6時間の間隔で、約6時間～約7時間の間隔で、約7時間～約8時間の間隔で、約8時間～約9時間の間隔で、約9時間～約10時間の間隔で、約10時間～約11時間の間隔で、約11時間～約12時間の間隔で、24時間以内の間隔で、または48時間以内の間隔で投与される。所定の実施形態において、2つ以上の薬剤は、同一の患者来訪において投与される。

【0138】

本発明の薬剤を投与する方法は、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、及び皮下、注入またはボラス注射を含む）、硬膜外、ならびに上皮または粘膜皮膚または粘膜内層（例えば、鼻腔内、口腔粘膜、直腸及び腸内粘膜等）を介した吸収によるものを含むが、これらに限定されない。特定の実施形態において、例えば、導入遺伝子がCNS内で発現されることが意図されている場合、ベクターは、腰椎穿刺を介して、または大槽を介して投与される。

【0139】

所定の実施形態において、本発明の薬剤は、静脈内に投与され、他の生物学的活性剤と一緒に投与され得る。

【0140】

別の特定の実施形態において、本発明の薬剤は、持続放出製剤で送達され得、例えば、その場合、製剤は、延長放出及びそれによる投与される薬剤の延長した半減期を提供する。使用に好適な制御放出システムとしては、拡散制御、溶媒制御、及び化学制御システムが挙げられるが、これらに限定されない。拡散制御システムは、例えば、本発明の分子が、拡散バリアを通る浸透によって分子の放出が制御されるように、デバイス内に囲まれているリザーバデバイスを含む。一般的なリザーバデバイスとしては、例えば、膜、カプセル、マイクロカプセル、リポソーム、及び中空繊維が挙げられる。モノリシック（マトリックス）デバイスは、第2のタイプの拡散制御システムであり、二重抗原結合分子は、速度制御マトリックス（例えば、ポリマーマトリックス）中に分散または溶解される。本発明の薬剤は、速度制御マトリックス全体を通して均質的に分散され得、放出の速度は、マトリックスを通じた拡散によって制御される。モノリシックマトリックスデバイスにおける使用に好適なポリマーとしては、天然ポリマー、合成ポリマー及び合成修飾天然ポリマー、ならびにポリマー誘導体が挙げられる。

【0141】

当業者に知られている任意の技術を使用して、本明細書に記載の1つ以上の薬剤を含む徐放性製剤を製造することができる。例えば、米国特許第4,526,938号、PCT公開第91/05548号、PCT公開第96/20698号、Ning et al., "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology, 39:179-189, 1996、Song et al., "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating

10

20

30

40

50

g Emulsions,” PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology, 50:372-397, 1995、Cleek et al., “Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application,” Pro. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 24:853-854, 1997、及び Lam et al., “Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery,” Proc. Int’l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater., 24:759-760, 1997（それらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。一実施形態において、ポンプは、制御放出システムにおいて使用され得る（Langer, 上記、Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng., 14:20, 1987、Buchwald et al., Surgery, 88:507, 1980、及び Saudek et al., N. Engl. J. Med., 321:574, 1989を参照されたい）。別の実施形態において、ポリマー材料を使用して、二重抗原結合分子またはその抗原結合断片を含む薬剤の制御放出を達成することができる（例えば、Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974)、Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, N. Y. (1984)、Ranger and Peppas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem., 23:61, 1983を参照されたい；また、Levy et al., Science, 228:190, 1985、During et al., Ann. Neurol., 25:351, 1989、Howard et al., J. Neurosurg., 71:105, 1989）、米国特許第5,679,377号、米国特許第5,916,597号、米国特許第5,912,015号、米国特許第5,989,463号、米国特許第5,128,326号、PCT公開第99/15154号、及びPCT公開第99/20253号も参照されたい）。さらに別の実施形態において、制御放出系は、治療標的（例えば、罹患関節）の近くに配置することができ、したがって、全身用量の一部のみを必要とする（例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 上記, vol. 2, pp. 115-138 (1984)を参照されたい）。他の制御放出システムは、Langer, Science, 249:1527-1533, 1990による概説において議論されている。

【0142】

また、rAAVは、科学研究、例えば、光遺伝学のためのインビボ送達導入遺伝子、miRNAでの遺伝子ノックダウン、条件的遺伝子欠損のためのリコンビナゼ送達、CRISPRでの遺伝子編集などのために使用され得る。

【0143】

5.5. 薬学的組成物及びキット

本発明は、薬学的に許容可能な担体及び本発明の薬剤を含む薬学的組成物をさらに提供し、上記薬剤は、本発明のrAAV分子を含む。いくつかの実施形態において、薬学的組成物は、対象への投与のための薬学的に許容可能な担体と組み合わせられたrAAVを含む。一実施形態において、「薬学的に許容可能な」という用語は、連邦もしくは州政府の規制当局によって承認されているまたは米国薬局方もしくは動物、より具体的にはヒトにおいて使用するための他の一般的に認識されている薬局方に列挙されていることを意味する。「担体」という用語は、薬剤とともに投与される希釈剤、アジュバント（例えば、フロイント完全及び不完全アジュバント）、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのような薬学的担体は、滅菌液体、例えば、水及び、例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油な

どを含む、石油、動物、植物、または合成起源のものを含む油であり得る。水は、薬学的組成物が静脈内に投与される場合に一般的な担体である。生理食塩溶液及び水性デキストロース及びグリセロール溶液もまた、液体担体、特に注射用溶液として用いられ得る。好適な医薬賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョコク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥脱脂乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。薬学的に許容される担体、賦形剤、及び安定剤の追加の例としては、限定されないが、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝剤、アスコルビン酸を含む抗酸化剤、低分子量ポリペプチド、血清アルブミン及びゼラチンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジンなどのアミノ酸、単糖、二糖類、及びグルコース、マンノース、またはデキストリンを含む他の炭水化物、EDTAなどのキレート剤、マニトールまたはソルビトールなどの糖アルコール、ナトリウムなどの塩形成対イオン、及び／または当該技術分野で知られているTWEEN（商標）、ポリエチレングリコール（PEG）、PLURONICS（商標）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。本発明の薬学的組成物はまた、上記の成分に加えて、潤滑剤、湿潤剤、甘味料、香味剤、乳化剤、懸濁剤、及び防腐剤も含むことができる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、粉末、徐放性製剤などの形態をとることができる。

10

【0144】

本発明の所定の実施形態において、薬学的組成物は、本発明の方法に従って使用するために提供され、上記薬学的組成物は、治療的及び／または予防的有効量の本発明の薬剤を薬学的に許容可能な担体と一緒に含む。

20

【0145】

所定の実施形態において、本発明の薬剤は、実質的に純粋である（すなわち、その効果を制限するまたは望ましくない副作用をもたらす物質を実質的に含まない）。特定の実施形態において、宿主または対象は、動物、例えば、哺乳動物、例えば、非霊長類（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど）及び霊長類（例えば、サル、例えば、カニクイザル及びヒト）である。所定の実施形態において、宿主は、ヒトである。

【0146】

本発明は、上記の方法において使用され得るキットをさらに提供する。一実施形態において、キットは、例えば、1つ以上の容器内に、本発明の1つ以上の薬剤を含む。別の実施形態において、キットは、1つ以上の容器内に状態の処置に有用な1つ以上の他の予防または治療剤をさらに含む。

30

【0147】

本発明はまた、薬剤及び活性剤の量を示すアンプルまたはサシエットなどの密封容器内にパッケージングされた本発明の薬剤も提供する。一実施形態において、薬剤は、密封容器内で乾燥滅菌凍結乾燥粉末または無水濃縮物として供給され、例えば、水または生理食塩水で、対象への投与のための適切な濃度に再構成することができる。典型的には、薬剤は、少なくとも5mg、より頻繁には少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg、または少なくとも75mgの単位投薬量で、密封容器において乾燥滅菌凍結乾燥粉末として供給される。凍結乾燥剤は、その元の容器において2～8℃で貯蔵されるべきであり、薬剤は、再構成後12時間以内、通常6時間以内、5時間以内、3時間以内、または1時間以内に投与されるべきである。代替的な実施形態において、本発明の薬剤は、薬剤または活性剤の量及び濃度を示す密封容器において液体形態で供給される。典型的には、薬剤の液体形態は、少なくとも1mg/ml、少なくとも2.5mg/ml、少なくとも5mg/ml、少なくとも8mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/kg、または少なくとも25mg/mlの密封容器で供給される。

40

【0148】

本発明の組成物は、薬学的組成物の製造に有用なバルク薬物組成物（例えば、不純また

50

は非滅菌組成物)、ならびに薬学的組成物(すなわち、対象または患者への投与に好適な組成物)を含む。バルク薬物組成物は、単位剤形の調製に使用することができ、例えば、本明細書に開示される予防的または治療的有效量の薬剤、またはそれらの薬剤と薬学的に許容可能な担体との組み合わせを含む。

【0149】

本発明は、本発明の薬剤のうちの1つ以上で満たされた1つ以上の容器を含む薬学的パックまたはキットをさらに提供する。追加的に、標的疾患または障害の処置に有用な1つ以上の他の予防的または治療的薬剤もまた、薬学的パックまたはキットに含まれ得る。本発明は、本発明の薬学的組成物の1つ以上の成分で満たされた1つ以上の容器を含む薬学的パックまたはキットもまた提供する。そのような容器(複数可)に任意に関連付けられるのは、医薬品または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形式の通知であり得、その通知は、ヒト投与のための製造、使用、または販売の機関による承認を反映する。

10

【0150】

一般的に、本発明の組成物の成分は、例えば、薬剤または活性剤の量を示すアンプルまたはサシエット等の密封容器において乾燥凍結乾燥粉末または無水濃縮物として、別々にまたは単位剤形と一緒に混合されて供給される。組成物が注入によって投与される場合、滅菌された医薬品グレードの水または生理食塩水を含む注入ボトルで調剤することができる。組成物が注射によって投与される場合、成分が投与前に混合され得るように、注射用または生理食塩水の滅菌水のアンプルを提供することができる。

20

【実施例】

【0151】

6. 実施例

以下の実施例は、挿入変異誘発を介するカプシド操作のための候補を特定するためのAAV9カプシド上の表面露出ループの分析を報告する。本発明は、例として示され、ヒト軸索ダイネイン重鎖尾部に基づいて設計された7merペプチドを含有するように操作されたrAAV9カプシドの構築を記載する。簡潔に述べると、短いペプチド挿入に適し得る表面ループを選択するために、3つの基準を使用した: 1) 隣接ループとの最小限の側鎖相互作用、2) 血清型間の可変配列及び構造(保存配列の欠如)、及び3) 一般的に標的とされる中和抗体エピトープを妨害する可能性。ペプチド挿入変異体のパネルを構築し、個々の変異体を、生存可能なカプシド組み立て、ペプチド表面露出、及び効力についてスクリーニングした。次いで、トップ候補をホーミングペプチドの挿入用のテンプレートとして使用して、これらのペプチド挿入ポイントを使用してrAAVベクターを目的の組織に再標的化できるかどうかを試験した。さらなる実施例は、本明細書に記載のある特定の修飾AAVカプシドに対する形質導入の増加及び組織向性を実証する。

30

【0152】

6.1. 実施例1-AAV9カプシドの分析

図1及び2は、他のAAVのVR-IV(図1)に対するアミノ酸配列比較によるアデノ随伴ウイルス9型の可変領域4(AAV9 VR-IV)の分析及びタンパク質モデル(図2)を示している。見てとれるように、AAV9 VR-IVは、3フォールドスパイクの先端または外側表面で表面上に露出している。さらなる分析は、VR-IVとVR-Vとの間のいくつかの側鎖相互作用が存在すること及びVR-IVの配列及び構造が、AAV血清型間で可変であること、及びさらに、一般的に標的とされる中和抗体エピトープを妨害し、それにより、修飾カプシドの免疫原性を減少させる潜在性が存在することを示していた。

40

【0153】

6.2. 実施例2-AAV9変異体の構築

8種のAAV9変異体を、各々がVR-IVループにおける異なる挿入点で異種ペプチドを含むように構築した。異種ペプチドは、表2に示されるように、pRGNX1090-1097として同定されたベクターにおける以下の残基の直後に挿入されたFLAGタ

50

グであった。

【表 3】

表 2

ベクター設計	FLAGタグのためのAAV9 VR-IV挿入部位
pRGNX1090	I451
pRGNX1091	N452
pRGNX1092	G453
pRGNX1093	S454
pRGNX1094	G455
pRGNX1095	Q456
pRGNX1096	N457
pRGNX1097	Q458

10

【0154】

6.3. 実施例3－パッケージング効率の分析

図3は、野生型AAV9及び8種の候補rAAV9ベクター（1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、及び1097）のmL当たりのゲノムコピー（GC/mL）の観点からの高パッケージング効率を示しており、候補ベクターは、各々、AAV9 VR-IVの中の異なる部位の直後にFLAG挿入物を含有する。全てのベクターを、10mLの培養物中でルシフェラーゼ導入遺伝子とともにパッケージングして、どの挿入ポイントがカプシドのパッケージングを中断しなかったかの決定を容易にし、エラーバーは、平均の標準誤差を示す。

20

【0155】

見てとれるように、全ての候補が高効率でパッケージングする。

【0156】

6.4. 実施例4－表面FLAG露出の分析

図4は、抗FLAG樹脂への結合による形質変換されたベクターの免疫沈降によって確認された、8種の候補修飾rAAV9ベクター（1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、及び1097）の各々におけるFLAG挿入物の表面露出を示している。抗FLAGへの結合は、表面上にペプチド挿入物を提示するカプシドの形成を可能にする挿入点を示している。

30

【0157】

形質導入された細胞を溶解し、遠心分離した。500μLの細胞培養上清を20μLのアガロース-FLAGビーズにロードし、ゲルにも直接的にロードされるSDS-PAGEローディングバッファーで溶出させた。陰性対照のため、FLAG挿入物を含有しない293-ssc上清を使用した。

40

【0158】

見てとれるように、1090は、候補ベクターのうち最も低い力価を有し、最も少ないタンパク質ブルダウンを示していた。陽性対照でも極めて低い力価が確認された。SDS-PAGEでの可視化のために十分ではない量の陽性対照がロードされたようである。

【0159】

6.5. 実施例5－形質導入効率の分析

図5A～5Bは、野生型AAV9（9-luc）、または8種の候補rAAV9ベクター（1090、1091、1092、1093、1094、1095、1096、及び1097）の各々のいずれかにパッケージングされた、導入遺伝子としてルシフェラーゼ遺

50

伝子を保有するカプシドベクターで形質導入された *Lec2* 細胞における形質導入効率を示しており、活性は、*9-luc* の活性を 100% としたルシフェラーゼ活性パーセントとして（図 5 A）、またはマイクログラム当たりのタンパク質の相対発光量（RLU）として（図 5 B）表される。

【0160】

CHO 由来 *Lec2* 細胞を α MEM 及び 10% FBS 中で成長させた。*Lec2* 細胞を約 2×10^8 GC ベクターの MOI（約 10,000 の MOI）で形質導入し、*Viraductin* 試薬で処置した（*Lec2* 細胞を約 10,000 GC/細胞の MOI で形質導入したが $40 \mu\text{g/mL}$ の塩化亜鉛（ ZnCl_2 ）で処置したものについて同様の結果が観察された。結果は示されていない）。*Lec2* 細胞は、CHO からのプロリン栄養要求株である。

10

【0161】

見てとれるように、インビボでの形質導入効率は、野生型 AAV9（*9-luc*）を使用して得られたものよりも低い。それにもかかわらず、先行研究は、ホーミングペプチドの導入が、非標的細胞（293、*Lec2*、または *HeLa* など）においてインビトロ遺伝子移行を減少させ得るのに対し、標的細胞におけるインビトロ遺伝子移行を有意に増加させることを示している（例えば、Nicklin et al., 2001、及び Grifman et al., 2001 参照）。

【0162】

6.6. 実施例 6 – 挿入ペプチドの組成及び長さの要因としてのパッケージング効率の分析

20

図 6 A は、様々なペプチドの長さ及び組成の AAV9 カプシドの S454 の直後（配列番号 67）の挿入が、パッケージング細胞株における AAV 粒子の生成効率に影響を及ぼし得ることを例示している棒グラフを示している。様々な組成及び長さの 10 種のペプチドを、AAV9 VR-IV の中の S454 の後（残基 454 と 455 の間）に挿入した。トランスフェクトから 5 日後のトランスフェクトされた浮遊 HEK293 細胞の収穫された上清について qPCR を実施した。棒グラフにおいて示された結果は、挿入物の性質及び長さが高力価で AAV 粒子が生成され、293 細胞にパッケージングされる能力に影響を及ぼすことを実証している。（エラーバーは、Y 軸に括弧で記されているペプチドの平均長さの標準誤差を表す）。

30

【0163】

S454 挿入部位に以下のペプチド配列（表 3）のホーミングペプチドを含有するカプシドタンパク質を有する AAV9 ベクターを研究した。浮遊適合 HEK293 細胞を、10 mL の培地中で形質導入の 1 日前に 1×10^6 細胞/mL で播種した。三重プラスミド DNA トランスフェクションを PEIpro（登録商標）（*Polypus transfection*）を用いて 1:1.75 の DNA:PEI 比で行った。トランスフェクションの 5 日後に細胞を遠心沈降し、上清を収穫し、 -80°C で保存した。

40

50

【表 4】

表 3.

ペプチド#	組織または標的名称	ペプチド配列	配列番号
P1	骨 1 (D8)	DDDDDDDD	2
P2	脳 1	LSSRLDA	3
P3	脳 2	CLSSRLDAC	4
P4	腎臓 1	LPVAS	6
P5	腎臓 2	CLPVASC	5
P6	筋肉 1	ASSLNIA	7
P7	TfR1	HAIYPRH	10
P8	TfR2	THRPPMWSPVWP	11
P9	TfR3	RTIGPSV	12
P10	TfR4	CRTIGPSVC	13

10

【0164】

20

トランスフェクションから5日後に収穫されたトランスフェクションされた浮遊HEK 293細胞の上清についてqPCRを実施した。試料をDNase I処置に供して残留プラスミドまたは細胞DNAを除去し、次いで熱処理してDNase Iを不活性化し、カプシドを変性させた。試料をTaqMan Universal PCR Master Mix、No AmpEraseUNG (ThermoFisherScientific) 及び導入遺伝子コンストラクトにパッケージングされたポリA配列に対するプライマー／プローブを使用してqPCRを介して力価測定した。標準曲線を、RGX-501ベクターBDSを使用して確立した。

【0165】

30

5～10アミノ酸長の範囲のS454の直後のペプチド挿入物は、適正な力価を有するAAV粒子を生成した一方で、12アミノ酸長を有するペプチド挿入物については有意なパッケージング欠損が観察されたことに伴い、サイズ上限がある可能性がある。

【0166】

6. 7. 実施例7 ホーミングペプチドは、S454の後に挿入された場合、インビトロでAAV9の形質導入特性を変化させる。

図6B～Eは、(図6B) Lec2細胞株(シアル酸欠損上皮細胞株)(図6C) HT-22細胞株(ニューロン細胞株)、(図6D) hCMEC/D3細胞株(脳内皮細胞株)、及び(図6E) C2C12細胞株(筋肉細胞株)の細胞培養物の蛍光画像を示している。AAV9野生型及びGFP導入遺伝子を含む表3のS454挿入ホーミングペプチドカプシドを使用して前述の細胞株に形質導入した。

40

【0167】

細胞株を形質導入の24時間前に5～20×10³細胞／ウェル(細胞株による)で96ウェルに播種した。細胞をAAV9-GFPベクター(挿入物を有するまたは有さない)で1×10¹⁰粒子／ウェルで形質導入し、各細胞株にける発現速度の相違に応じて、形質導入から48～96時間後にCytation5 (BioTek)を介して分析した。Lec2細胞を実施例5のように培養し、血液脳関門hCMEC/D3 (EMD Millipore)細胞を製造業者のプロトコルに従って培養し、HT-22及びHUH7細胞をDMEM及び10% FBS中で培養し、C2C12筋芽細胞をDMEM及び10% FBSに播種し、2%ウマ血清及び0.1%インスリンが補充されたDMEM中でトランスフェクション前の3日間分化させた。AAV9.S454.FLAGは、試験された全

50

ての細胞タイプにおいて低い形質導入レベルを示した。

【0168】

画像は、未修飾AAV9カプシドと比較して、AAV9カプシドタンパク質においてS454の後に挿入された場合、ホーミングペプチドがインビトロでAAV9の形質導入特性を変化させ得ることを示している。全ての細胞株についてP7（TfR1ペプチド、HA IYPRH（配列番号10））が最も高い形質導入速度を示し、P9（TfR3ペプチド、RTIGPSV（配列番号12））が続く。P4（腎臓1ペプチド、LPVAS（配列番号6））は、全ての細胞タイプについて、AAV9野生型よりもわずかに高い形質導入速度を示した。Lec2及びHT-22細胞株培養物と比較して、脳内皮hCMC/D3細胞株及びC2C12筋肉細胞株培養物中のP6（筋肉1ペプチド、ASSLNIA（配列番号7））についてより高い形質導入率が観察された。P1ベクターは、形質導入効率が極めて低いため画像に含まれず、P8ベクターは、力価が低いため含まれなかった。

10

【0169】

6.8. 実施例8 ペプチド挿入点のためのAAVカプシドの分析

図7は、開始コドンVP2、可変領域1（VR-I）、可変領域4（VR-IV）、及び可変領域8（VR-VIII）の中またはその付近でのヒトペプチドの挿入部位内のカプシド配列の挿入部位内のAAV1~9e、rh10、rh20、rh39、rh74、hu12、hu21、hu26、hu37、hu51、及びhu53カプシド配列の配置を灰色で強調表示したものであり、各カプシドタンパク質の可変領域8（VR-VIII）内の特定の挿入部位は、記号「#」（AAV9のアミノ酸番号付けによるアミノ酸残基588の後）によって示されている。

20

【0170】

6.9. 実施例9 様々なベクターのAAVゲノムコピー／μgゲノムDNAの比較

図8は、AAVベクターの投与後に、マウス脳細胞において発現されるGFP（緑色蛍光タンパク質）導入遺伝子のコピーを示す：AAV9、AAV.PHP.eB、AAV.hDyn（588~589の間のTLAPFK（配列番号1）を有するが、カプシド配列への他のアミノ酸修飾を伴わないAAV9）、AAV.PHP.S、及びAAV.PHP.SH（表17を参照されたい）。

【0171】

AAV.PHP.Bは、AAV9カプシドにTLAPFK（配列番号20）挿入を有するカプシドであり、カプシド配列に他のアミノ酸修飾はない。AAV.PHP.eBは、AAV9カプシドにTLAPFK（配列番号20）挿入を有するカプシドであり、PHP.B挿入の上流にあるカプシド配列の2つのアミノ酸修飾を有する（表17も参照されたい）。表4Aは、本研究において利用されたカプシドを要約する。

30

40

50

【表 5】

表 4 A

名称	親 カプシド	変異	挿入の位置 2	ペプチド 2	配列番号
AAV9	AAV9	-	-	-	
PHP.B	AAV9	-	588_589	TLAVPFK	20
PHP.eB	AAV9	586A_587Q delinsDG	588_589	TLAVPFK	20
AAV.hDyn	AAV9	-	588_589	TLAAPFK	1
AAV.PHP.S	AAV9	-	588_589	QAVRTSL	16
AAV.PHP.SH	AAV9	-	588_589	QAVRTSH	17

10

【0172】

材料及び方法

GFP 導入遺伝子をコードする AAV9、AAV.PHP.eB、AAV.hDyn、AAV.PHP.S 及び AAV.PHP.SH のコンストラクトを調製し、 $1 \times PBS + 0.001\%$ ブルロニック中で製剤化した。雌の C57BL/6 マウスを、1 日目の体重に基づいて処置群に無作為化した。5 群の雌の C57BL/6 マウスそれぞれに、以下の表 4 B に従って、AAV9.GFP、AAV.PHP.eB.GFP、AAV.hDyn.GFP、AAV.PHP.S.GFP または AAV.PHP.SH.GFP を静脈投与した。投薬体積は、 10 mL/kg (0.200 mL/20 g マウス) であった。マウスは、開始日に 8 ~ 12 週齢であった。投与後 15 日目に、動物を安楽死させ、脳組織、肝臓、前肢二頭筋、心臓、腎臓、肺、卵巣、及び坐骨神経を含む末梢組織を収集した。

20

【表 6】

表 4 B

群	数	薬剤	製剤用量	経路	スケジュール
1	9	AAV9	2.5×10^{12} GC/kg	iv	1 日目
2	5	PHP.eB	2.5×10^{12} GC/kg	iv	1 日目
3	5	hDyn	2.5×10^{12} GC/kg	iv	1 日目
4	5	PHP.S	2.5×10^{12} GC/kg	iv	1 日目
5	5	PHP.SH	2.5×10^{12} GC/kg	iv	1 日目

30

40

【0173】

定量 PCR (qPCR) を使用して脳ゲノム DNA の μg 当たりのベクターゲノムの数を決定した。注射されたマウスからの脳試料を処理し、Qiagen 製の Blood and Tissue Genomic DNA キットを使用してゲノム DNA を単離した。標準曲線法に従って eGFP に特異的なプライマー-プローブの組み合わせを使用して QuantStudio 5 装置 (Life Technologies Inc) で qPCR アッセイを実行した。

【0174】

50

脳ゲノムDNAの μg 当たりのAAVベクターゲノムコピーは、他の全ての血清型：AAV9、AAV.PHP.eB、PHP.S及びPHP.SHと比較して、AAV.hDynが投与されたマウスでは少なくとも1 log 高かった（図8を参照されたい）。この研究で見られるように、AAV9カプシドの残基588～589間の「TLAAPFK」（配列番号1）ペプチド挿入物（ヒト軸系ダイニン由来のペプチド）を含有するAAV9カプシドであるAAV.hDynについては、GC/ μg ゲノムDNAが最も高い。研究は、eGFPを保有するAAV.hDynが全身的に投与された5匹のマウスにおいて、平均で 1×10^4 GC/ μg 導入遺伝子を超えてマウス脳における形質導入を実証した。しかしながら、「TLAVPFK」（配列番号20）配列（マウスダイニン由来のペプチド）を含むベクターであるAAV.PHP.eBを含む他の修飾されたAAV9カプシドは、全身治療時に 1×10^3 GC/ μg 未満の導入遺伝子マウス脳中の形質導入を実証した。

10

【0175】

6.10. 実施例10—TLAAPFK（配列番号2）を含有するrAAVカプシドの構築

図9Aは、VR-IIIVのQ588とA589との間のアミノ酸配列TLAAPFK（配列番号1）のペプチド挿入を含む組換えAAV9ベクターカプシドのアミノ酸配列を示す。挿入されたペプチドは太字。

【0176】

図9Bは、VR-IIIVのS268とS269との間のアミノ酸配列TLAAPFK（配列番号1）のペプチド挿入を含む組換えAAV9ベクターカプシドのアミノ酸配列を示す。挿入されたペプチドは太字。

20

【0177】

図9Cは、VR-IVのS454とG455との間のアミノ酸配列TLAAPFK（配列番号1）のペプチド挿入を含む組換えAAV9ベクターカプシドのアミノ酸配列を示す。挿入されたペプチドは太字。

【0178】

6.11. 実施例11：インビトロ及びインビボにおける修飾カプシドの評価

AAVカプシド配列を、ペプチド挿入または誘導変異誘発のいずれかによって修飾し、プールして、GFP発現カセットでパッケージングされたバーコード化ライブラリを得た。次いで、修飾ベクターを、次世代シーケンシング（NGS）及び定量的PCRを使用して、インビトロアッセイにおいて、ならびにマウスにおけるインビボ生体分布について評価した。AAV.hDynを、このプールからの高脳形質導入ベクターとして同定し、その形質導入プロファイルを特徴付けるために、マウスにおける個々の送達研究においてさらに評価した。追加的に、このベクターの細胞向性を理解するために、脳切片の免疫組織化学分析を実行した。

30

【0179】

6.11.1 実施例11A—血液脳関門通過の形質導入のインビトロ試験

修飾されたカプシドが血液脳関門を通過する能力を、hCMC/D3 BBB細胞（SCC066、Millipore—Sigma）を使用したインビトロトランスウェルアッセイにおいて試験した（図10A～10Bを参照されたい）。より具体的には、このアッセイは、Sade, H. et al. (2014 PLoS ONE 9(4): e96340) A human Blood-Brain Barrier transcytosis assay reveals Antibody Transcytosis influenced by pH-dependent Receptor Binding, April 2014, Vol. 9, Issue 4、及びZhang, X., Blood-brain barrier shuttle peptides enhance AAV transduction in the brain after systemic administration, 2018 Biomaterials 176: 71–83を本質的に適合させた。簡潔には、 5×10^4 個のhCMC/D3細胞/ cm^2 を12ウェルプレートにおいてコラーゲン被覆トランスウェル

40

50

インサートに播種した。各インサートは、500 μ Lの培地を含有し、下部チャンバは、1 mLの培地を含有していた。培地を1日おきに交換した。播種後10日の時点で上清を除去した（ゼロ（0）時点）。この0時点で、 1×10^9 GCのベクターを上部インサートチャンバの培地に加えることによって細胞を形質導入した。10 μ Lの下部チャンバの上清試料を形質導入から0.5、3、6、及び23時間後に間隔を空けて試験のために取り除いた。各条件（ベクター）を二重に試験し、力価についてポリAに対するqPCRを介して三重に測定した。

【0180】

図10A～10Bは、血液脳関門（BBB）細胞層を通過するAAV.hDyn（アミノ酸残基588～589の間にTLAAPFK（配列番号1）を有するAAV9）のインビトロトランスウェルアッセイを示し（図10A）、結果は、AAV.hDyn（図において逆三角形によって示される）が、AAV9（正方形）よりも速く、AAV2（円）よりも速く、かつより大きな範囲でアッセイのBBB細胞層を通過することを示す（図10B）。開発されたインビトロアッセイは、向上したBBB通過トラフィックを予測し、同様のアッセイは、他の器官への標的化を予測するためにも使用され得る。

【0181】

6.11.2 実施例11B－修飾カプシドの形質導入及び生体内分布

6.11.2.1 材料及び方法

カプシド修飾は、VR-IVの位置S454の後（表5a～5c）、またはAAVカプシドのVR-VIII表面露出ループの位置Q588の後に様々なペプチド配列を挿入することによって、ならびにアミノ酸137（AAV4、AAV4-4、及びAAV5）またはアミノ酸138（AAV1、AAV2、AAV3、AAV3-3、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV9e、rh.10、rh.20、rh.39、rh.74、及びhu.37）で開始するVP2の開始コドンの後の挿入によって（図7）、AAV8、AAV9、及びAAVrh.10を含む広く使用されているAAVカプシド上で実行した（また、ある特定のカプシド配列については表17も参照されたい）。選択された単数～複数のアミノ酸変異もまた、カプシドを修飾するために使用した。また、Yost et al., Structure-guided engineering of surface exposed loops on AAV Capsids. 2019 . ASGCT Annual Meeting、及びWu et al., 2000 J. Virology（上記）も参照されたい。パッケージング効率は、小規模ではこれらのカプシド修飾のいずれの後にも悪影響を受けないことが確認された。

【0182】

特定の修飾カプシドを有するrAAVを、実施例5において上述したように、Lec2細胞においてインビトロで形質導入について試験した。Lec2細胞における形質導入について試験された修飾AAVは以下の通りである：AAV9と比較して、eB 588 Ad、eB 588 Hep、eB 588 p79、eB 588 Rab、AAV9 588 Ad、AAV9 588 Hep、AAV9 588 p79、AAV9 588 Rab、eB VP2 Ad、eB VP2 Hep、eB VP2 p79、eB VP2 Rab、AAV9 VP2 Ad、AAV9 VP2 Hep、AAV9 VP2 p79、AAV9 VP2 Rab。AAVカプシドの同一性については、以下の表5Bを参照されたい。

【0183】

生体内分布を試験するために、修飾されたAAVを、各々の個々のカプシドに対応する特定のバーコードを含有するeGFP導入遺伝子カセットとともにパッケージングした。スクリーニングの効率を増加させるために新規バーコード化ベクターをプールし、マウスに注射した。

【0184】

遺伝子改変されたAAVベクターの生体内分布を分析するために、GFPをコードする様々なベクターを調製し、 $1 \times \text{PBS} + 0.0001\%$ プルロニック酸中で配合した。全

てのベクターは、次世代シーケンシング（NGS）ライブラリ（プール）の調製を可能にするために10bpのバーコードを含有するシスプラスミドを用いて作製した。3つのベクタープール（研究1、研究2及び研究3ベクター）を、表5A～Cに従って5匹の雌C57BL/6マウスのコホートに静脈内注射した。投薬体積は各々10mL/kg（0.2mL/20gマウス）であった。

【0185】

マウスを1日目の体重に基づいて処置群に無作為化し、開始日におけるマウスの年齢は8～12週であった。投与後15日目に、動物を安楽死させ、脳、腎臓、肝臓、坐骨神経、肺、心臓、及び筋肉組織を含む末梢組織を収集した。プールからの選択されたカプシドを個々に注射した研究において、同じプロトコルに従った。

10

【0186】

Qiagen製のDNeasy Blood and Tissue kit（69506）を使用してゲノムDNA（gDNA）を組織試料から単離した。各ベクターのバーコード領域を、製造業者（Illumina）によって推奨されているように、NGS及びユニークデュアルインデックス（UDI）及びマルチプレックスシーケンシング戦略のためのオーバーラップを含有するプライマーで増幅させた。試薬ナノ及びマイクロキットv2（MS-103-1001/1002）を使用するIllumina MiSeqを使用して、マウスから収集された試料につき各々のバーコード化AAVベクターの相対的存在量を決定した。したがって、以下の表5A～Cにおける各ベクター試料を上記のようにバーコード化して、各リードの特定を可能にし、選別してから最終データ分析をした。当初注射されたプールにおけるAAVの組成に基づいてデータを正規化し、バーコード化試料に特異的なプライマー-プローブの組み合わせを用いたqPCR分析から得られた総ゲノムコピー数を使用して定量した。

20

30

40

50

【表 7】

表 5 A

研究 1	名称	カプシド	挿入点	ペプチド	注記
BC01	AAV9	AAV9	-	-	青色のバー、図 21
BC02	PHP.eB	PHP.eB	588_589	TLAVPFK (配列 番号 20)	
BC03	AAV8.BBB	修飾された AAV8	-	-	A269S
BC04	AAV9.BBB	修飾された AAV9	-	-	S263G/S269T/A27 3T
BC05	AAV8.BBB.L D	修飾された AAV8	-	-	A269S、498- NNN/AAA-500
BC06	AAV9.BBB.L D	修飾された AAV9	-	-	S263G/S269T/A27 3T、496- NNN/AAA-498
BC07	rh.10	rh.10	-	-	
BC08	rh.10.LD	修飾された rh.10	-	-	498-NNN/AAA- 500
BC09	AAV.hDyn	修飾された AAV9	588_589	TLAAPFK (配列 番号 1)	橙色のバー、図 21
BC10	PHP.S	PHP.S	588_589	QAVRTSL (配列 番号 16)	-
BC11	PHP.SH	PHP.SH	588_589	QAVRTSH(配列 番号 17)	-
BC13	rh39	rh.39	-	-	-

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

表 5 B

研究 2	名称	カプシド	挿入点	ペプチド	注記
BC20	eB 588 Ad	PHP.eB	588_589	SITLVKSTQTV (配列番号 14)	TLAVPFK ペプチド を置換する (配列番 号 20)
BC21	eB 588 Hep	PHP.eB	588_589	TILSRSTQTG (配列番号 15)	TLAVPFK ペプチド を置換する (配列番 号 20)
BC22	eB 588 p79	PHP.eB	588_589	VVMVGEKPITITQHSVETEG (配列番号 18)	TLAVPFK ペプチド を置換する (配列番 号 20)
BC23	eB 588 Rab	PHP.eB	588_589	RSSEEDKSTQTT (配列番号 19)	TLAVPFK ペプチド を置換する (配列番 号 20)
BC24	9 588 Ad	AAV9	588_589	SITLVKSTQTV (配列番号 14)	
BC25	9 588 Hep	AAV9	588_589	TILSRSTQTG (配列番号 15)	
BC26	9 588 p79	AAV9	588_589	VVMVGEKPITITQHSVETEG (配列番号 18)	
BC27	9 588 Rab	AAV9	588_589	RSSEEDKSTQTT (配列番号 19)	
BC28	eB VP2 Ad	PHP.eB	138_139	SITLVKSTQTV (配列番号 14)	残基 588 の後にまた TLAVPF (配列番号 20) 挿入物を有する
BC29	eB VP2 Hep	PHP.eB	138_139	TILSRSTQTG (配列番号 15)	残基 588 の後にまた TLAVPFK (配列番 号 20) 挿入物を有 する
BC30	eB VP2 p79	PHP.eB	138_139	VVMVGEKPITITQHSVETEG (配列番号 18)	残基 588 の後にまた TLAVPFK (配列番 号 20) 挿入物を有 する
BC31	AAV9	AAV9	-	-	
BC32	eB VP2 Rab	PHP.eB	138_139	RSSEEDKSTQTT (配列番号 19)	残基 588 の後にまた TLAVPFK (配列番 号 20) 挿入物を有 する

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

研究 2	名称	カプシド	挿入点	ペプチド	注記
BC33	9 VP2 Ad	AAV9	138_139	SITLVKSTQTV (配列番号 14)	
BC34	9 VP2 Hep	AAV9	138_139	TILSRSTQTG (配列番号 15)	
BC35	9 VP2 p79	AAV9	138_139	VVMVGEKPITITQHSVETEG (配列番号 18)	
BC36	9 VP2 Rab	AAV9	138_139	RSSEEDKSTQTT (配列番号 19)	

10

【表 9】

表 5 C

研究 3	名称	カプシド	挿入点	ペプチド	注記
BC01	AAV9	AAV9	-	-	
BC03	AAV8-BBB	AAV8	-	-	A269S
BC07	rh10	rh.10	-	-	
BC09	AAV.hDyn	AAV.hDyn	588_589	TLAAPFK (配列番号 1)	
BC12	PHP.B	PHP.B	588_589	TLAVPFK (配列番号 20)	
BC20	AAV9 S454-D8	AAV9	454_455	DDDDDDDD (配列番号 2)	
BC22	AAV9 S454-脳 1	AAV9	454_455	LSSRLDA (配列番号 3)	
BC23	AAV9 S454-脳 1C	AAV9	454_455	CLSSRLDAC (配列番号 4)	
BC24	AAV9 S454-腎臓 1	AAV9	454_455	LPVAS (配列番号 6)	
BC25	AAV9 S454-腎臓 1C	AAV9	454_455	CLPVASC (配列番号 5)	
BC26	AAV9 S454-筋肉 1	AAV9	454_455	ASSLNIA (配列番号 7)	
BC27	AAV9 S454-TfR1	AAV9	454_455	HAIYPRH (配列番号 10)	
BC29	AAV9 S454-TfR3	AAV9	454_455	RTIGPSV (配列番号 12)	
BC30	AAV9 S454-TfR4	AAV9	454_455	CRTIGPSVC (配列番号 13)	
BC31	AAV9 S454-FLAG	AAV9	454_455	DYKDDDDK (配列番号 21)	
BC37	pRGX1005- PHP.eB (BC なし)	PHP.eB	588_589	TLAVPFK (配列番号 20)	

20

30

40

【0187】

プールから選択されたカプシドが個別に注射される研究において、qPCRは、組織ゲノムDNAのug当たりのベクターゲノムの数を決定するために使用された。標準曲線法に従ってeGFPに特異的なプライマー-プローブの組み合わせを使用して、Quant Studio 5 (Life Technologies, Inc.) でqPCRを実行

50

した（図12）。

【0188】

個々のベクターを特徴付けのためにマウスに注射した研究から、ホルマリン固定したマウス脳を振動ブレードミクロトーム（VT1000S, Leica）で40μmの厚さで切片化し、浮遊切片をGFPに対する抗体でプローブし、送達されたベクターの細胞分布を調べた。

【0189】

より具体的には、AAV.hDynが注射されたマウスからの固定した脳をVibratome（Leica, VT-1000）を使用して切片化し、抗GFP抗体（AB3080, Millipore Sigma）、Vectastain ABC kit（PK-6100, Vector Labs）及びDAB Peroxidase kit（SK-4100, Vector Labs）を使用してGFP発現を評価した。AAV.hDynが注射されたマウスにおける脳全体を通してGFP発現細胞の広い分布が存在し、これには、脳の皮質、線条体、及び海馬における分布が含まれていた。図13A～13Cは、これらの領域からの画像を示し、スケールバーは400μmである（以下で説明する）。

10

【0190】

6.11.2.2 結果

結果を図11、図12A～12H、及び図13A～13Cに示す。

【0191】

Lec2細胞形質導入アッセイのデータは示されていない。AAV9 588 Hep（588位の後に挿入されたペプチドTILSRSTQTG（配列番号15）5を有するAAV9）は、野生型AAV9よりも有意に大きい形質導入（4倍）を示し、AAV9 VP2 Ad（138位の後に挿入されたペプチドSITLVKSTQTV（配列番号14）を有するAAV9）、AAV9 VP2 Hep（138位の後に挿入されたペプチドTILSRSTQTG（配列番号15）を有するAAV9）、及びAAV9 VP2 Rab（138位の後に挿入されたペプチドRSSEEDKSTQTT（配列番号19）を有するAAV9）は、AAV9と比較してLec2細胞のわずかに大きな形質導入を示した。アッセイされた他のAAVは、AAV9よりも低いレベルの形質導入を示した。

20

【0192】

図11は、脳gDNAの次世代シーケンシング（NGS）分析の結果を示しており、静脈内注射の後にマウス脳に送達されたカプシドプールの相対的存在量（組成パーセント）を明らかにしている。当初注射されたプールにおけるAAVの組成に基づいてデータを正規化し、eGFP配列に特異的なプライマー-プローブの組み合わせを用いたqPCR分析から得られた総ゲノムコピー数を使用して定量した。示されているデータは、3つの異なる実験からのものである。点線は、どのベクターと一緒にプールされていたかを示している。親AAV9を標準として使用し、各プールに含めた。「BC」識別子は、上記の表5A、5B、及び5Cに示されるものである。

30

【0193】

図12A～12Hは、雌のC57Bl/6マウスにおけるAAV.hDynのインビボ形質導入プロファイルを示し、ナীবマウス、または脳（図12A）、肝臓（図12B）、心臓（図12C）、肺（図12D）、腎臓（図12E）、骨格筋（図12F）、坐骨神経（図12G）、及び卵巣（図12H）にAAV9またはAAV.hDynのいずれかを注射されたマウスにおけるコピー数/マイクログラムgDNAを示し、AAV.hDynが、AAV9と比較して増加した脳の生体内分布を示す。脳ゲノムDNAのμg当たりのAAVベクターゲノムコピーは、親AAV9ベクターと比較して、AAV.hDynが投与されたマウスでは少なくとも1log高かった。

40

【0194】

図13A～13Cは、上述の免疫組織化学分析において分析された領域からの画像を示し、スケールバーは400μmである。図13A～13Cは、脳全体にわたるAAV.h

50

DynからのGFPの分布を示し、ここで、線条体（図13A）、海馬（図13B）、及び皮質（図13C）からの脳切片の免疫組織化学的染色の画像は、修飾されたベクターによる脳の全体的な形質導入を明らかにした。

【0195】

6.11.2.3 結論

VR-IV及びVR-VIIIの表面露出ループにおける挿入によってまたは特定のアミノ酸変異によってのいずれかで実施されたAAVカプシド修飾は、それらのパッケージング効率に影響を及ぼさず、本明細書に記載の生成システムにおいて同様の力価をもたらすことができた。

【0196】

AAV-hDynのマウスへの静脈内投与は、試験された他の修飾AAVベクター及びAAV9より高いウイルスゲノムの相対的存在量及びより多い脳細胞形質導入をもたらした。

【表10】

表6. 生体内分布研究で使用するホーミングペプチド

名称	カプシド	ペプチド挿入の位置	ペプチド名	ペプチド配列	配列番号
AAV9	AAV9	454_455	-	-	
AAV9 S454-P2	AAV9	454_455	脳1	LSSRLDA	3
AAV9 S454-P3	AAV9	454_455	脳2 (脳1C)	CLSSRLDAC	4
AAV9 S454-P4	AAV9	454_455	腎臓1	LPVAS	6
AAV9 S454-P5	AAV9	454_455	腎臓2 (腎臓1C)	CLPVASC	5
AAV9 S454-P6	AAV9	454_455	筋肉1	ASSLNIA	7
AAV9 S454-P7	AAV9	454_455	Tfr1	HAIYPRH	10
AAV9 S454-P9	AAV9	454_455	Tfr3	RTIGPSV	12
AAV9 S454-P10	AAV9	454_455	Tfr4	CRTIGPSVC	13

【0197】

表面露出ループVR-IVにおける異なるホーミングペプチドの挿入によって実行されたAAVカプシド修飾は、それらのパッケージング効率に影響を及ぼさず、本明細書に記載の生成システムにおいて同様の力価をもたらすことができた。

【0198】

AAV9 S454腎臓1及びAAV9 S454腎臓1Cのマウスへの静脈内投与は、試験された他の修飾AAV9ベクター及び親AAV9ベクターより高いウイルスゲノムの相対的存在量及びより多い腎細胞形質導入をもたらした。AAV9 S454腎臓1またはAAV9 S454筋肉1ベクターのマウスへの静脈内投与はまた、より低い肝細胞形質導入をもたらした。

【0199】

6.12. 実施例12-TLAVPFK（配列番号20）を含有するrAAVカプシドの構築

図25は、VR-IVのS454とG455との間のアミノ酸配列TLAVPFK（配列番号20）のペプチド挿入を含む組換えAAV9ベクターカプシドのアミノ酸配列を示す。

【0200】

6.13. 実施例13-カニクイザルにおけるrAAVベクタープールの生体内分布

カニクイザルにおける単回の静脈内、脳室内または硝子体内注射後に、操作されたカプシド及びGFP導入遺伝子を有する組換えAAVのプールの投与、インビボ及び死後の観察、ならびに生体内分布を評価した（表7）。プールは、カニクイザルへの投与後に次世代シーケンシング（NGS）分析を使用した識別を可能にする独自のバーコード識別を各々が含有する複数のカプシドを含有した。カニクイザルは、その有用性が確立され、大型動物種におけるAAV生体内分布研究のモデル及びヒトへのさらなる翻訳のモデルとして受け入れられているため、試験システムとして選択されている。本研究に参加した全ての動物は、以前の処置に関してナীবである。プールは、表7に列挙された修飾されたカプシドを有する少なくとも以下の組換えAAVを含み得る。

【表11-1】

10

表7. カニクイザル研究のための組換えAAV

名称	カプシド	カプシド修飾	挿入の位置	ペプチド	ペプチド配列番号
AAV8	AAV8	-	-	-	
AAV8.BBB	修飾された AAV8	A269S	-	-	
AAV8.BBB.LD	修飾された AAV8	A269S、498-NNN/AAA-500	-	-	
AAV9	AAV9	-	-	-	
AAV9 S454-脳1	AAV9	-	454_455	LSSRLDA	3
AAV9 S454-脳1C	AAV9	-	454_455	CLSSRLDAC	4
AAV9 S454-D8	AAV9	-	454_455	DDDDDDDD	2
AAV9 S454-腎臓1	AAV9	-	454_455	LPVAS	6
AAV9 S454-腎臓1C	AAV9	-	454_455	CLPVASC	5
AAV9 S454-筋肉1	AAV9	-	454_455	ASSLNIA	7
AAV9 S454-Tfr1	AAV9	-	454_455	HAIYPRH	10
AAV9 S454-Tfr3	AAV9	-	454_455	RTIGPSV	1219
AAV9 S454-Tfr3C	AAV9	-	454_455	CRTIGPSVC	13
AAV9.496NNN/AA498	修飾された AAV9	498-NNN/AAA-500	-	-	
AAV9.496NNN/AA498.W503R	修飾された AAV9	498-NNN/AAA-500、W503R	-	-	
AAV9.N272A.496NN/AAA498	修飾された AAV9	N272A、496-NNN/AAA-498			
AAV9.G266A.496NN/AAA498	修飾された AAV9	G266A、496-NNN/AAA-498			
AAV9.588Ad	AAV9	-	588_589	SITLVKSTQTV	14
AAV9.588Herp	AAV9	-	588_589	TILSRSTQTG	15
AAV9.BBB	修飾された AAV9	S263G/S269T/A273T	-	-	
AAV9.BBB.LD	修飾された AAV9	S263G/S269T/A273T、496-NNN/AAA-498	-	-	

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

名称	カプシド	カプシド修飾	挿入の位置	ペプチド	ペプチド配列番号
AAV9.Q474A	修飾された AAV9	Q474A	-	-	
AAV9.W503R	修飾された AAV9	W503R	-	-	
AAVPHPeB.VP2Ad	PHP.eB	-	138_139	SITLVKSTQTV	14
AAVPHPeB.VP2Herp	PHP.eB	-	138_139	TILSRSTQTG	15
PHP.B	AAV9	-	588_589	TLAVPFK	20
PHP.eB	修飾された PHP.B	A587D、Q588G	588_589	TLAVPFK	20
PHP.hB					
PHP.S	AAV9	-	588_589	QAVRTSL	16
PHP.SH	AAV9	-	588_589	QAVRTSH	17

10

20

【0201】

6.13.1. 研究デザイン

9匹の雌カニクイザル動物を使用する。臨床兆候データ及び事前スクリーニング抗体価に基づいて実験に好適であると判断された動物を、コンピューター生成乱数を使用して体重により試験群に配置する。3つの異なる投与経路を使用し、関連する組織を収集して、異なる経路に関連する生体内分布（NGS及びPCRによって測定）を評価する。3匹の動物には、脳室内（ICV）用量投与のために左側心室にカテーテルが植え込まれ（群1）、3匹の動物には、単回の静脈内注入が行われ（群2）、3匹の動物には、単回の硝子体内注射が行われる（群3）。2匹の動物が代替動物となり、必要に応じて植え込まれる。群1の動物は、適切なICVカテーテル配置の座標を決定するためにMRIスキャンを受ける。

30

【0202】

IV注入を3mL／分の速度で投与し、続いて0.2mLのビヒクルを投与して、IVカテーテルから用量をフラッシュする。3匹の静脈内動物は、4mL／kgの体積でプールされた組換えAAVの単回用量を受ける。総用量（vg）及び用量体積（mL／kg）を生データに記録する。文献レビュー及び非ヒト霊長類における以前の研究に基づいて、 1×10^{13} GC／kg体重のIV用量が、全身送達ならびに骨格筋を含む末梢組織からのCNSにおける所望の分布を有することが必要であると決定された。

【0203】

ICV植え込み動物は、1mLの体積のAAV-NAV-GFPbc（遅い注入により、およそ0.1mL／分）で単回ボラス投与を受け、続いて0.1mLのビヒクルを受けてカテーテルシステムから用量をフラッシュする。ICV用量は、現在の臨床プログラムをサポートするために、以前の非ヒト霊長類研究の分布データに基づいている。

40

【0204】

硝子体内（IVT）注射を、50μLの用量体積でボラス注射として両側に投与する。

【0205】

6.13.2. 観察及び検査

臨床的兆候を少なくとも1日1回記録し、これは投薬の開始のおよそ2週間前から開始して研究期間全体にわたって継続する。動物を臨床的効果、疾病、及び／または死亡の兆

50

候について観察する。追加の観察は、研究責任者及び／または技術者の裁量により、動物の状態に基づいて記録することができる。

【0206】

用量投与前、及び2日目、8日目、15日目及び22日目に、群3動物に対して眼科検査を実施する。全ての動物に、1日目以降に実施された眼科検査のために塩酸ケタミンIMで鎮静させた。1日目の検査では、動物を注射麻酔で鎮静させる（セクション15.3.3を参照されたい）。検査の前に1%トロピカミドで眼を広げる。検査には、スリットランプ生体顕微鏡検査及び間接眼鏡検査が含まれる。追加的に、投薬前、用量投与直後（約10～15分）、ならびに2日目及び22日目に群3動物に対して圧平眼圧測定を実行した。

10

【0207】

用量投与のおよそ2～3週前に中和抗体分析のために末梢静脈から血液試料（約3mL）を収集する。

【0208】

6.13.3. 生化学的分析試料収集

群2（IV）のみににおける動物からの用量投与前、用量投与の3（±10分）、6（±10分）及び24（±0.5時間）時間後に、生化学的分析（AAVカプシドクリアランス）のために末梢静脈から全血試料（約0.5mL）を収集する。シリンジ及び針を使用して試料を収集し、2つのK2 EDTA管に移し、時間を記録する。

【0209】

用量投与前（1日目）、8日目及び15日目、ならびに剖検前（22日目）のPBMC分析のために、絶食した動物から、末梢静脈から血液試料（約5mL）を採取する。リチウムヘパリン管を使用して試料を収集し、時間を記録する。

20

【0210】

用量投与（1日目、2mL）及び剖検（22日目、5mL）の前に、生化学的分析のために末梢静脈から血液試料を採取する。凝固管に試料を収集し、時間を記録する。完全に凝固するまで管を室温で維持し、次いでおよそ2400rpmにて室温で15分間遠心分離する。血清を収穫し、ラベル付きバイアル（剖検試料を1mLのアリコートに分割する）に入れ、液体窒素中で凍結させ、-60℃以下で保存する。

【0211】

用量投与の前に、CSF（約1.5mL）を、群1のみの動物からの大槽脊椎穿刺から収集する。全ての動物（群1～3）からの大槽脊椎穿刺から剖検の直前に、CSF（約2mL）を収集する。CSFの収集を試みるが、脊椎穿刺に失敗したため、試料を動物（複数可）から全ての間隔で収集することはできない。収集後、試料は処理するまで氷上に保管される。

30

【0212】

6.13.4 剖検

死亡して発見された、または瀕死 殺した動物、及び処置の少なくとも21日後（22日目）に計画されていた剖検時に全般的剖検を実施する。死亡して発見されたものを除く全ての動物を8mg/kgのケタミンHCl IMで鎮静化し、イソフルラン／酸素混合物で維持し、ヘパリンナトリウムの静脈内ボラス（200IU/kg）を提供する。動物に、生理食塩水中0.001%の亜硝酸ナトリウムを、左心室を介して灌流する。死亡して発見された動物は剖検されるが、灌流されない。

40

【0213】

以下の組織を全ての動物（死亡して発見されたものを含む）から保存する：骨髄、脳、盲腸、結腸、背側神経根及び神経節、十二指腸、食道、視神経を有する眼、総病変、心臓、回腸、空腸、腎臓、膝関節、肝臓、気管支を伴う肺、リンパ節、卵巣、脾臓、坐骨神経、骨格筋、脊髄、脾臓、甲状腺、気管、及び迷走神経。

【0214】

6.13.5. 生化学的分析

50

群 2 (I V) の動物から収集した全血を、q P C R 及び次世代シーケンシング (N G S) によって評価する。

【0215】

必要に応じて、全ての動物から収集した P B M C 試料を、フローサイトメトリー及び酵素結合免疫吸収スポット (E L I S p o t) によって評価する。

【0216】

必要に応じて、血清及び／または C S F 中の循環中和抗体ならびに遊離ベクターの存在を、E L I S A 及び細胞ベースのアッセイによって評価する。

【0217】

組織中のベクターコピー数及び転写物の数を、定量的 P C R 及び N G S 法によって調べる。

【0218】

6. 1 4. 実施例 1 4 - 静脈内投与による C N S 生体内分布の研究

カニクイザルモデルに静脈内投与される r A A V カプシドのプールの生体内分布を研究するために、実施例 1 3 に記載されるような手順を使用した。いくつかのカプシドは、ほとんどの脳領域、特に A A V 4、A A V 5、r h 3 4、h u 2 6、r h 3 1、及び h u 1 3 において、高い相対的存在量 (A A V 9 参照カプシドと比較して R A) を有する C N S において良好な広がりを示した。C N S 向性を示す好ましいカプシドは、後根神経節 (D R G) を除き、少なくとも 1 つの C N S 領域における D N A 値の 1. 1 倍以上の増加をもたらす D N A R A 値を有する。

【0219】

図 1 5 は、カニクイザルモデルの前頭皮質におけるウイルスゲノム (入力に正規化された) の相対的存在量 (R A) を示し、表 8 は、図 1 5 に示される最も高い R A を有するそれらのカプシドの R A 値を列挙する。

【表 1 2】

表 8 :

試料番号	血清型	相対的存在量	p 値
BC085	AAV4	32643.06	<0.0001
BC086	AAV5	836.64	0.0043
BC076	AAV.rh34	735.19	0.0296
BC049	AAV.hu26	606.37	ns
BC059	AAV.hu56	518.54	ns
BC057	AAV.hu53	444.2	ns
BC088	AAV7	427.28	ns
BC003	AAV8.BBB	359.84	ns
BC044	AAV.hu13	341.58	ns
BC075	AAV.rh31	339.86	ns

【0220】

図 1 6 及び 1 7 は、それぞれ、カニクイザルモデルの海馬及び小脳におけるウイルスゲノム (入力に正規化された) の R A を示す。A A V. r h 3 4 の R A は、グラフの左側のシェーディングされた列によって示され、A A V 9 参照の R A は、グラフの中央のシェーディングされた列によって示される。図 1 6 及び 1 7 は、A A V. r h 3 4 が、静脈内投与プール内で上位パフォーマンスのカプシドであることを示す。

【0221】

AAV.rh34は、CNS毒性に関しても良好なプロファイルを示した。rh34カプシドは、高い前頭皮質向性（形質導入効率）を示しながら、後根神経節（DRG）における形質導入の減少を示した。AAVrh34は、以下のようにCNS領域においてRA～AAV9の増加を示す：海馬で1.8倍、前頭皮質で7.4倍、扁桃体で1.9倍、髄質で6.0倍、中脳で3.1倍、視床下部で1.2倍、視床で8.8倍、淡蒼球で13倍、SNcで5.7倍、背側縫線で3.5倍、前障で2.0倍、被核で13倍、後頭部皮質で9倍、小脳で9.6倍。追加的に、AAVrh34は、以下において減少したRAを示す：DRG：90～99.5%、肝臓：約99%、二頭筋：約30%、坐骨神経：83%、及び視神経：17%。

【0222】

10

図18は、FCにおける上位の45パフォーマー（AAV9に対する最高RA）、ならびに頸部、胸部、及び腰部DRGにおける下位の45パフォーマー（AAV9に対する最低RA）のベン図を示し、AAVrh34カプシドは、カプシドのプールの中で45の各群に存在した唯一のカプシドとして示される。これらの列挙された特徴の組み合わせを有するAAVカプシドは、AAVカプシドを投与される対象において、DRGにおけるそれらの低い形質導入速度が最小限の神経毒性及び／または低減したもしくは無視できる軸索障害症状を有するべきであるように、「DRGに優しい」カプシドとみなされる。

【0223】

6.15. 実施例15：脳室内（ICV）投与によるCNS生体内分布の研究

ICV投与を伴う実施例13に記載されるような手順を使用して、カニクイザルモデルへのrAAVカプシドのプールの生体内分布を研究した。いくつかのカプシドは、ほとんどの脳領域、特にAAV4、AAV5、rh34、hu26、rh31、及びhu13において、高い相対的存在量（AAV9参照カプシドと比較してRA）を有するCNSにおいて良好な広がりを示した。CNS向性を示す好ましいカプシドは、後根神経節（DRG）を除き、少なくとも1つのCNS領域におけるDNA値の1.1倍以上の増加をもたらすDNA相対存在量値を有する。

20

【0224】

図19は、カニクイザルモデルの前頭皮質におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）のRAを示し、表9は、図19に示される最も高いRAを有するそれらのカプシドのRA値を列挙する。

30

【表13】

表9.

試料番号	血清型	RA	p 値
BC083	AAV1	1499.86	<0.0001
BC003	AAV8.BBB	762.42	0.0151
BC077	AAV.rh4	659.09	ns
BC054	AAV.hu38	638.06	ns
BC086	AAV5	612.54	ns
BC079	AAV.rh46	588.72	ns
BC089	AAV8.BBB	574.48	ns
BC087	AAV6	520.67	ns
BC081	AAV.rh72	512.76	ns

40

【0225】

図20は、カニクイザルモデルの海馬におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）

50

の相対的存在量を示し、表 10 は、図 20 に示される最も高い R A を有するそれらのカプシドの R A 値を列挙する。

【表 14】

表 10.

ソートされた BC	正規化されたソートされた相対的存在量	血清型	p 値
BC105	125921.21	AAV2	ns
BC062	81149.18	AAV2 7m8	ns
BC087	50962.40	AAV6	ns
BC083	25800.48	AAV1	ns
BC032	8113.37	AAVrh2	ns
BC126	4169.21	AAVrh73	ns
BC102	3673.77	AAV8Y733F	ns
BC085	3397.77	AAV4	ns
BC003	3279.18	AAV8.BBB	0.007
BC073	2609.49	AAVrh24	ns

10

20

【0226】

図 21 は、カニクイザルモデルの中脳におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の相対的存在量（R A）を示し、表 11 は、図 21 に示される最も高い R A を有するそれらのカプシドの R A 値を列挙する。

【表 15】

表 11.

ソートされた BC	正規化されたソートされた相対的存在量	血清型	p 値
BC062	2077.07	AAV 7m8	<0.0001
BC085	1057.83	AAV4	0.0002
BC087	859.50	AAV6	0.0104
BC015	833.34	AAV27m8	0.0164
BC086	827.35	AAV5	0.0181
BC096	417.06	AAV8 Y444F	0.9781
BC098	407.57	AAV8 Y447F	ns
BC079	383.98	AAVrh46	ns
BC083	301.08	AAV1	ns
BC102	295.67	AAV8 Y733F	ns

30

40

【0227】

図 22 は、カニクイザルモデルの小脳におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の R A を示し、表 12 は、図 22 に示される最も高い R A を有するそれらのカプシドの R A 値を列挙する。

50

【表 1 6】

表 1 2.

ソートされた BC	正規化されたソートされた RA	血清型	p 値
BC083	1170.50	AAV1	<0.0001
BC003	671.84	AAV8.BBB	<0.0001
BC077	531.50	AAV rh4	0.0004
BC079	515.31	AAVrh46	0.0008
BC054	510.51	AAVhu38	0.001
BC100	479.36	AAV8Y707F	0.0038
BC127	470.57	AAVrh2.R1.V651F	0.0054
BC081	467.79	AAVrh72	0.006
BC053	447.81	AAVhu37	0.0128
BC091	445.93	AAV9Y6F	0.0137

10

【0 2 2 8】

図 2 3 は、カニクイザルモデルの頸部 DRG におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の RA を示し、表 1 3 は、図 2 3 に示される最も高い RA を有するそれらのカプシドの RA 値を列挙する。

20

【表 1 7】

表 1 3.

ソートされた BC	正規化されたソートされた RA	血清型	p 値
BC062	12040.24	AAV2 7m8	<0.0001
BC015	9522.20	AAV2	<0.0001
BC126	7170.76	AAVrh73	ns (0.2422)
BC086	4760.90	AAV5	<0.0001
BC084	2640.55	AAV3B	ns
BC083	1808.40	AAV1	ns
BC003	1192.23	AAV8.BBB	ns
BC085	922.02	AAV4	ns
BC087	875.60	AAV6	ns
BC077	826.27	AAVrh4	ns

30

40

【0 2 2 9】

図 2 4 は、カニクイザルモデルの腰部 DRG におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の RA を示し、表 1 4 は、図 2 4 に示される最も高い RA を有するそれらのカプシドの RA 値を列挙する。

50

【表 1 8】

表 1 4.

ソートされた BC	正規化されたソートされた RA	血清型	p 値
BC015	5649.13	AAV2	ns (0.9996)
BC126	4840.36	AAVrh73	<0.0001
BC083	4002.82	AAV1	0.0021
BC086	3794.13	AAV5	0.0051
BC003	2847.53	AAV8.BBB	ns
BC131	2427.59	AAVrh64.R1	ns
BC062	2367.34	AAV2 7m8	ns
BC100	2000.82	AAV8 Y707F	ns
BC077	1988.30	AAV rh4	ns
BC053	1947.15	AAVhu37	ns

10

【0 2 3 0】

20

図 2 5 は、I C V 投与後に前頭皮質、海馬、中脳及び小脳を形質導入する上位パフォーマンスの 1 5 カプシドのベン図を示す。図に示されるように、A A V 6、A A V 8 . B B B、A A V . r h . 4 6、及び A A V 1 は、上位パフォーマンス群の各々に表される唯一の A A V であった。

【0 2 3 1】

図 2 6 は、海馬を標的とする D R G に優しいカプシドを同定するために、海馬を形質導入する上位パフォーマンスの 4 5 カプシド、及び D R G に対する形質導入値が最も低い 4 5 カプシドのベン図を示す。図に示されるように、A A V . h u . 6 0、A A V . r h . 2 1、A A V . P H P . h B、A A V . r h . 1 5、A A V . r h . 2 4、A A V 9 . W 5 0 3 R、h u . 5、A A V 9 . Q 4 7 4 A、及び A A V . h u . 1 0 は、各群に表される唯一の A A V であった。

30

【0 2 3 2】

6 . 1 6 . 実施例 1 6 - 静脈内 (I V) 投与による筋肉及び肝臓の生体内分布の研究

I V 投与を伴う実施例 1 3 に記載されるような手順を使用して、カニクイザルモデルへの r A A V カプシドのプールの筋肉及び肝臓の生体内分布を研究した。

【0 2 3 3】

図 2 7 は、筋肉を標的とする肝臓に優しいカプシドを同定するために、心臓、二頭筋、及び腓腹筋を形質導入する上位パフォーマンスの 4 0 カプシド、ならびに肝臓に対する形質導入値が最も低い 4 0 カプシドのベン図を示す。図に示されるように、A A V . P H P e B . V P 2 H e r p は、各群において表される唯一の A A V であった。

40

【0 2 3 4】

図 2 8 は、心臓、二頭筋、及び腓腹筋を形質導入する上位パフォーマンスの 1 5 カプシドのベン図を示し、表 1 5 は、図の 3 つの異なる細胞における上位パフォーマンスのカプシドのリストを提供する。

50

【表 1 9】

表 1 5.

ダイアグラム細胞	合計	血清型
二頭筋、腓腹筋、心臓	4	Hu. 10、AAV3B、AAV2. 7m8、AAV9. Q474A
二頭筋、腓腹筋、	1	AAV5
心臓	3	Rh. 15、PHP. hB、修飾されたAAV8

10

【0235】

図 29A 及び B は、それぞれ、カニクイザルモデルの腓腹筋及び肝臓におけるウイルスゲノム（入力に正規化された）の RA を示す。

【0236】

表 16 は、カニクイザルモデル及び MDX マウスモデルの RA 値による各カプシドのランクを提供する。カプシドを各動物において互いに相対的にランク付けして、動物間の変動を減少させた。腓腹筋、TA、心臓、二頭筋、及び三頭筋は、MDX マウスモデルのランキングに 70% 寄与し、腓腹筋、心臓、及び二頭筋は、カニクイザルモデルのランキングに 70% 寄与した。肝 RA は、各動物のランキングに 30% 寄与した。全体のランキングは、各動物のランキングを 50% 重み付けすることによって決定された。

20

【表 2 0】

表 1 6.

血清型	NH/C.サルランク	MDX ランク	全体ランク
AAV9.W503R	3	1	1
AAV9.Q474A	4	10	3
AAV9.BBB	15	2	4
AAV9 S454-腎臓 1	2	21	7
AAV.hu32	7	17	9
AAV.rh13	24	5	12
AAV.rh15	8	25	13
AAV9 S454-腎臓 1C	5	31	17
AAV9	36	6	18

30

40

【0237】

6. 17. 実施例 17：カプシドライブラリの静脈内投与後の肝臓脱標的化生体内分布の研究

プールされたバーコード化ベクターを、IV 注射によって NHP に投与した。プールされた混合物は、本明細書に記載されるように、普遍的な CAG プロモーターからの GFP レポーター遺伝子を発現する天然分離株及び操作された AAV を含む 118 の異なる AAV カプシドからなる。静脈内研究は、以下の実施例 13 及び 14 に記載されるプロトコルに従った。いくつかのカプシドは、肝臓を「脱標的化する」向性を示し、そのようなもの

50

として、変異したカプシドは、親カプシド（AAV9）よりも肝臓組織において低い存在量を示した（例えば、AAV8.BBB.LD（A269S、498-NNN/AAA-500）、AAV9.BBB.LD（S263G/S269T/A273T、496-NNN/AAA-498）、AAV9.496-NNN-498、AAV9.496-NNN-498.W503R、AAV9.W503R、及びAAV9.Q474A）。NNN/AAA変異を有するAAV8カプシドは、肝臓における形質導入の全体的なおよそ11倍の低減、及び肝臓における転写産物の発現の42倍の低減を示す。NNN/AAA及びW503R変異を有するAAV9カプシドは、肝臓における形質導入のおよそ400倍の低減を示し、肝臓における転写産物のゼロ発現をもたらす。いくつかの例では、これらの修飾されたベクターの脳分布も減少した。AAV8.BBB.LDは、追加的に、腓腹筋において高いレベルの形質導入を示す。

10

【0238】

図31は、カプシドライブラリのIV投与後のNHPにおける、様々な組織における選択された「肝臓脱標的化」（LD）ベクターの、親AAV9カプシドと比較した生体内分布を示す。図32は、カプシドライブラリのIV投与後のNHPにおける、様々な組織における選択されたLDベクターの、親AAV8カプシドと比較した生体内分布を示す。

【0239】

研究はまた、IVカプシドライブラリ投与の3時間後及び24時間後の各バーコード（及びしたがってカプシド）の存在量に対する相対的存在量（入力のために調整され、1に正規化される）の変化を示す（3時間でのRA/24時間でのRA）。個々の動物は、異なる形状データポイント（合計3匹の動物）によって示される（図33A及び33B）。

20

【0240】

倍率変化>1は、投薬後3時間と比較して、24時間で血液中に存在する総カプシド「プール」の割合が低いこと（すなわち、より速い血液クリアランス）を示す。倍率変化<1は、投薬後3時間と比較して、24時間で血液中に存在する総カプシド「プール」の割合が高いこと（すなわち、より遅い血液クリアランス）を示す。歴史的に、より遅いクリアランスは、より低い肝臓形質導入/肝臓脱標的化と相関する。

【0241】

血液貯留の増加によって表されるように、所与の動物における所与のカプシドの存在量における変化の描写をプロットした。例えば、AAV9のベースライン貯留期間にわたる血液貯留の倍率増加の計算を可能にするために、表現（図34A及び34B）は、選択されたカプシドの存在量値における変化を、親カプシドの存在量における変化と比較する（親カプシドを1に設定する）。したがって、AAV9カプシドへの様々な変異は、循環中の貯留を3～5倍増加させる（例えば、図34Aを参照されたい）。

30

【0242】

6.18 実施例18-mdxマウスへのカプシドプールの静脈内（IV）投与による筋肉、肝臓及び脳の生体内分布の研究

プールされたバーコード化ベクターを、IV（尾静脈）注射によってmdxマウスに投与した。プールされた混合物は、本明細書に記載されるように、普遍的なCAGプロモーターからのGFレポーター遺伝子を発現する天然分離株及び操作されたAAVを含む118の異なるAAVカプシドからなる。IV研究は、以下の実施例12及び16に記載されているものに類似するプロトコルに従った。

40

【0243】

3週間での 殺時に、組織を採取し、RNA laterを有するチューブ中で（製造業者の指示に従って）試料を採取し、DNA及びRNA分析（プール内の各ベクターの生体内分布）がNGSによって実施されるまで-80℃で急速冷凍した（図36A～36Hを参照されたい）。

【0244】

6.19 カプシドアミノ酸配列

表17は、本明細書に記載の研究において記載及び/または使用される、ある特定の操

50

作されたカプシドタンパク質のアミノ酸配列を提供する。異種ペプチド及びアミノ酸置換は、灰色のシェーディングで示されている。

【表 2 1 - 1】

表 1 7. カプシドアミノ酸配列

カプシド名	挿入または置換	アミノ酸配列
PHP.S (<i>California Institute of Technology- Chan et al 2017</i>)	QAVRTSL (配列番号 16) (588_589)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDT E 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDENRFH CHFSPRDWQR 301 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 361 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 421 PFHSSYAHSQ SLDRMLNPLI DQYLYLSRT INSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 541 LIFGKQGTGR DNVDADKVM I TNEEEIKTTN PVATESYQV ATNHQSAQQA VRTSLAQQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNT P 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS K RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号22)
PHP.S H	QAVRTSH (配列番号 17)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 61 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDT E 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 2】

カブシド 名	挿入または 置換	アミノ酸配列
	(588_589)	241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 301 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 361 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 421 PFHSSYAHSQ SLDRMLNPLI DQYLYLSRT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 541 LIFGKQGTGR DNVDAKVM I TNEEEIKTTN PVATESYQGV ATNHQSAQQA VRTSHAAQQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPWIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号 23)
PHP.B (California Institute of Technol ogy GenBan k entry: ALU851 56.1- Deverm an et al 2016)	TLAVPFK (配列番号 20) (588_589)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 61 KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAV FQ 121 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMAAGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 301 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 361 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 421 PFHSSYAHSQ SLDRMLNPLI DQYLYLSRT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 541 LIFGKQGTGR DNVDAKVM I TNEEEIKTTN PVATESYQGV ATNHQSAQQA AVFFKAQQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPWIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号 24)
PHP.e B (California Institute of Technol ogy- Chan et al 2017)	TLAVPFK (配列番号 27) (588_589)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 61 KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAV FQ 121 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 181 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMAAGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 241 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDFNRFH CHFSPRDWQR 301 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 361 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 421 PFHSSYAHSQ SLDRMLNPLI DQYLYLSRT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 481 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 541 LIFGKQGTGR DNVDAKVM I TNEEEIKTTN PVATESYQGV ATNHQSDGTT AVFFKAQQT 601 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPWIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNTP 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号 25)
AAV8. BBB	A269S	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPY KYLGPFNGLD 60 KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLQAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAV FQ 120 AKKRVLLEPLG LVEEGAKTAP GKRPVEPSP QRSPTSSTGI GKKGQQPARK RLNFQGTGDS 180 ESVPDPQPLG EPPAAPSGVG PNTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGD RVI 240 ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDFNRF HCHFSPRDWQ 300 RLINNNWGFR PKRLSFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA 360 HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFQFTYTFED 420 VPFHSSYAH S QSLDRMLNPL IDQYLYLSR TQTGTGTANT QTLGFSQGGP NTMANQAKNW 480 LPGPCYRQQR VSTTTGQNNN SNFAWTAGTK YHLNGRNSLA NPGIAMATHK DDEERFFPSN 540 GILIFGKQNA ARDNADYS DV MLTSEEEIKT TNPVATEEYG IVADNLQQQN TAPQIGTVNS 600 QGALPGMVWQ NRDVYLQGP I WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPPQIL IKNTPVPADP 660 PTTFNQSKLN SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP E IQYTSNYYKS TSVDFAVANTE 720 GYSEPRPIG TRYLTRNL (配列番号 26)
AAV8. BBB. LD	A269S、 498_NNN/ AAA_500	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPY KYLGPFNGLD 60 KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLQAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAV FQ 120 AKKRVLLEPLG LVEEGAKTAP GKRPVEPSP QRSPTSSTGI GKKGQQPARK RLNFQGTGDS 180 ESVPDPQPLG EPPAAPSGVG PNTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGD RVI 240 ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDFNRF HCHFSPRDWQ 300 RLINNNWGFR PKRLSFKLFN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA 360 HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFQFTYTFED 420 VPFHSSYAH S QSLDRMLNPL IDQYLYLSR TQTGTGTANT QTLGFSQGGP NTMANQAKNW 480 LPGPCYRQQR VSTTTGQNNN SNFAWTAGTK YHLNGRNSLA NPGIAMATHK DDEERFFPSN 540 GILIFGKQNA ARDNADYS DV MLTSEEEIKT TNPVATEEYG IVADNLQQQN TAPQIGTVNS 600 QGALPGMVWQ NRDVYLQGP I WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPPQIL IKNTPVPADP 660

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 3】

カブシド 名	挿入または 置換	アミノ酸配列
		PTTFNQSKLN SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP E IQYTSNYYKS TSVDFAVNTE 720 GVYSEPRPIG TRYLTRNL (配列番号27)
AAV9. BBB	S263G/ S269T/ A273T	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVDPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRN YIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGVV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNGQ 600 ILPGMVWQDR DVYLQGGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELOKE NSKRWNP EIQ YTSNYYKSNN VEFVAVNTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (配列番号28)
AAV9. BBB. LD	S263G/ S269T/ A273T、 496_NNN/ AAA_498	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVDPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRN YIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGVV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNGQ 600 ILPGMVWQDR DVYLQGGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELOKE NSKRWNP EIQ YTSNYYKSNN VEFVAVNTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (配列番号29)
AAVrh .10.LD	498_NNN/ AAA_500	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP KPKANQQHQD DGRGLVLPGY 50 KYLGPFGNLD KGEVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADA EF 100 QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLLEPLG LVEEGA KTAP GKRPVEPSP 150 QRSPTSSTGI GKKGQPAKK RLNFQQTGDS ESDVPDPQPIG EPPAGPSGLG 200 SGTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGD RVI 250 PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRFH HCHFSPRDWQ 300 RLINNNWGFR PKRLNFKLFNI QVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE 350 YQLPYVLGSA HQGCLPPFPA DVFMIPQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY 400 FPSQMLRTGN NFEFSYQFED VPFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR 450 TQSTGGTAGT QQLLFSQAGP NNMSAQAKNW LPGPCYRQQR VSTTSLQAAA 500 SNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATHK DDEERFFPSS GVLMEFGKQA 550 GKDNVDYSSV MLTSEEEIKT TNPVATEQYG VVADNLQQQN AAPIVGAVNS 600 QGALPGMVWQ NRDVYLQGP I WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPPQIL 650 IKNTPVPADP PTTFSSQAKLA SFITQYSTGQ VSVEIEWELQ KENSKRWNP E 700 IQYTSNYYKS TNVDFAVNTD GTYSEPRPIG TRYLTRNL (配列番号30)
AAV9. 496NN N/AA A498	498_NNN/ AAA_500	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVDPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRN YIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADK VMI TNEEEIKTTN PVATESYGVV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNGQ 600 ILPGMVWQDR DVYLQGGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELOKE NSKRWNP EIQ YTSNYYKSNN VEFVAVNTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (配列番号31)
AAV9. 496NN N/AA A498. W503 R	496NNN/ AAA498、 W503R	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVDPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INSGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRN YIP 480

10

20

30

40

【表 2 1 - 4】

カブシド 名	挿入または 置換	アミノ酸配列
		GPSYRQQRVS TTVTQAAASE FARPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADKVM TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNG 600 ILPGMVWQDR DVYLQGGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSN VFAVNTTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (配列番号32)
AAV9 W503 R	W503R	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGRVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSRWDQR 300 LINNNWGFRR KRLNFKLENI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPOGYGL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRMLNPLI DQYLYLSKT INSGSQNGQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FARPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADKVM TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNG 600 ILPGMVWQDR DVYLQGGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSN VFAVNTTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (配列番号33)
AAV9 Q474A	Q474A	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGRVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSRWDQR 300 LINNNWGFRR KRLNFKLENI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPOGYGL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRMLNPLI DQYLYLSKT INSGSQNGQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FARPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADKVM TNEEEIKTTN PVATESYGQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNG 600 ILPGMVWQDR DVYLQGGPIWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSN VFAVNTTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (配列番号34)
AAV9 S454- D8	骨1、 DDDDDD D(配列番号 9) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGRVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSRWDQR 300 LINNNWGFRR KRLNFKLENI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPOGYGL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRMLNPLI DQYLYLSKT INSGSQNGQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYP 480 QGRNYPGPS YRQQRVSTTV TQNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 541 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 601 GWVQNGQILP GMVWQDRDVI LQGGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNT 661 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYYKSNVVEF 721 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号35)
AAV9 S454- 脳1	脳1、 LSSRLDA (配列番号 10) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGRVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSRWDQR 300 LINNNWGFRR KRLNFKLENI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPOGYGL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRMLNPLI DQYLYLSKT INSGSQNGQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYP 480 QGRNYPGPS YRQQRVSTTV TQNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNGQILP GMVWQDRDVI LQGGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNT 660 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYYKSNVVEF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号36)
AAV9 S454- 脳2	脳2/ 脳1C、 CLSSRLDA C(配列 番号)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPGNGLD 60 KGEVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADAEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGRVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSRWDQR 300 LINNNWGFRR KRLNFKLENI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPOGYGL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQSYEFENV 420

10

20

30

40

【表 2 1 - 5】

カプシド名	挿入または置換	アミノ酸配列
	11) (454_455)	PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSCLSSRL DAGGQNQQT L KFSVAGPSNM AV 482 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 542 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 602 GWVQNQGILP GMVWQDRDVI LQGGPIWAKIP HTDGNFHPS LMGGFQGMKHP PPQILIKNT 662 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSV EWELOKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 722 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号 37)
AAV9 S454- 腎臓 1	腎臓1、 LPVAS (配列番号 13) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGVLVPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNFRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMI PQYGYL TLNDGSQAVG RSSFCYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSCLSSRL DAGGQNQQT LKF SVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 538 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 598 GWVQNQGILP GMVWQDRDVI LQGGPIWAKIP HTDGNFHPS LMGGFQGMKHP PPQILIKNT 658 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSV EWELOKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 718 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号 38)
AAV9 S454- 腎臓 2	腎臓2/ 腎臓1C、 CLPVASC (配列番号 12) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGVLVPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNFRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMI PQYGYL TLNDGSQAVG RSSFCYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSCLSSRL DAGGQNQQT LKF SVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVI LQGGPIWAKIP HTDGNFHPS LMGGFQGMKHP PPQILIKNT 660 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSV EWELOKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号 39)
AAV9 S454- 筋肉 1	筋肉1、 ASSLNIA (配列番号 14) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGVLVPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNFRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMI PQYGYL TLNDGSQAVG RSSFCYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSCLSSRL DAGGQNQQT LKF SVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVI LQGGPIWAKIP HTDGNFHPS LMGGFQGMKHP PPQILIKNT 660 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSV EWELOKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号 40)
AAV9 S454- Tfr1	Tfr1、 HAIYPR (配列番号 59) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGVLVPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNFRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMI PQYGYL TLNDGSQAVG RSSFCYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSCLSSRL DAGGQNQQT LKF SVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVI LQGGPIWAKIP HTDGNFHPS LMGGFQGMKHP PPQILIKNT 660 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSV EWELOKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号 41)
AAV9 S454- Tfr3	Tfr3、 RTIGPSV (配列番号 59) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGVLVPGY KYLGPGNGLD 60 KGEPVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLLEPLG LVEEAAKTAP GKRRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNFRFH CHFSPRDWQR 300

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 6】

カプシド名	挿入または置換	アミノ酸配列
	19) (454_455)	LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLEPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSQGNQQT LKFSVAGPSNMAV 480 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 540 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 600 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNT 660 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 720 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号42)
AAV9 S454- Tfr4 (AAV9 S454- Tfr3C)	Tfr4、 CRTIGPSV C (配列 番号20) (454_455)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 60 KGEFVNAAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNFRFH CHFSRWDQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLEPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSQGNQQT LKFSVAGPSNMAV 482 QGRNYIPGPS YRQQRVSTTV TQNNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNPGPA MASHKEGEDR 542 FFPLSGSLIF GKQGTGRDNV DADKVMITNE EEIKTTNPVA TESYGQVATN HQSAQAQAQT 602 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNT 662 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 722 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号43)
AAV9. 588Ad (9 588 Ad)	SITLVKST QTV (配 列番号 21)、 DLC-AS1 (588_589)	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 60 KGEFVNAAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNFRFH CHFSRWDQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLEPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSQGNQQT LKFSVAGPSNMAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSI SITLVKSTQTV EFAWPGASSW ALNGRNSLMN GPAMASHKE 540 GEDRFFPLSG SLIFGKQGTG RDNVDADKVM ITNEEEIKTT NPVATESYGV VATNHQSAQA 600 QAQTGWVQNG GILPGMVWQD RDVYLQGPWI AKIPHTDGNF HPSPLMGGFG MKHPPQIL 660 KNTVPVADPP TAFNKDKLNS FITQYSTGQV SVELEWELQK ENSKRWNPEI QYTSNYYKSN 720 NVEFAVNTEG VYSEPRPIGT RYLTRNL (配列番号44)
AAV9. 588 Herp (9 588 Hep)	TILSRSTQ TG (配 列番号 22)、DLC- AS2、 588_589	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 60 KGEFVNAAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 180 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNFRFH CHFSRWDQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLEPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSKT INGSQGNQQT LKFSVAGPSNMAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQNNNTI TILSRSTQ TILSRSTQ FAWPGASSW LNGRNSLMNP GPAMASHKEG 540 EDRFFPLSGS LIFGKQGTGR DNVADKVM ITNEEEIKTT NPVATESYGV ATNHQSAQAQ 600 AQTGWVQNG ILPGMVWQDR DVYLQGPWI KIPHTDGNF HPSPLMGGFGM KHPPQILIK 660 NTPVPADPPT AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYYKSNN 720 VEFVNTEG VYSEPRPIGT RYLTRNL (配列番号45)
AAVP HPeB. VP2Ad	SITLVKST QTV (配 列番号 21)、DLC- AS1 (138_139)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPY KYLGPGNGLD 61 KGEFVNAAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP TILSRSTQ TILSRSTQ GKRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFQGTGDTE 191 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGD RVI 251 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNFRFH CHFSRWDQR 311 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 371 EGCLEPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 431 PFHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYYLSRT INGSQGNQQT LKFSVAGPSNMAVQGRNYIP 491 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSW LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 551 LIFGKQGTGR DNVADKVM ITNEEEIKTT NPVATESYGV ATNHQSDGTL AVFKAQAQT 611 GWVQNQGILP GMVWQDRDVY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNT 671 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYYKSNNVEF 731 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号46)

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 7】

カプシド名	挿入または置換	アミノ酸配列
AAVP HPeB VP2He rp	TILSRSTQ TG (配列番号 22)、DLC-AS2、(138_139)	1 MAADGYLPDW LEDNLSEGR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPNGGLD 61 KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 121 AKRRLLEPLG LVEEAAKTST TLVKSTQIVA PGKKRPVEQS PQEPDSSAGI GKSGAQPAKK RLNFGQTGDT E 192 SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI 252 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 312 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 372 EGCLPPFPAD VFMI PQYGYL TLNDGSAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 432 PFHSSYAHSQ SLDRMLNPLI DQYLYLSRT INSGGQNT Q LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 492 GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDREFFPLSGS 552 LIFGKQGTGR DNVADKVM I TNEEEIKTTN PVATESYQV ATNHQSDGT AVPEKAQAQT 612 GWVQNQGILP GMVWQDRD VY LQGPIWAKIP HTDGNFHPSP LMGGFGMKHP PPQILIKNT 672 VPADPPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENS RWNPEIQYTS NYKSNNVF 732 AVNTEGVYSE PRPIGTRYLT RNL (配列番号 47)
rh34	-	MAADGYLPDWLEDNLSEGREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYEYLGPFNGLDKGEFVNAAD AAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADA EFQERLKEDTSF GGNLGRAVFQAKKRVLLEPLGLVEEGA KTA PGKKRPLES PQEPDSSSGIGKKGQPAKKRLNFEEDTGAGDGPPEGSDTSAMSSDIEMRAAPGGNA V AGQSGDGVGNASGDWHDSTWSEGVTTTSTRTWVLTPTYNHLYLRLGTTSSNTYNGFSTPWGYFDN RFHCHFSPRDWQRLINNNWGLRPAKMRVKI FNIQVKEVTTSNGETTVANNLTSTVQIFADSSYELPYV M DAGQEGSLPFPNDVFMV PQYGYL TGENQNQTD RNAFYCYLEYFSPQMLRTGNNFETAYNEKVPFH SMYAHSSQSLDGLMNP LLDQYLWHLQSTTSGETLNQNAATTFGKIRSGDFAFYRKNWLPGPCVKQQRFS KTASQNYKIPASGGNALLKYDTHYTLNRRWSNIAPGPPMATAGPSDGFSAQLIFPGPSVTGNTTSA NNLLFTSEEEIATNPRD TMFGQIADNNQNTATPITGNVTAMGVLP GMVWQNRDIYYQGIWAKIPH ADGHFHPSP LIGGFG LKHPPPQIFIKNTPVPAYPATTFTAARVDSFITQYSTGQVAVQIEWEIEKERSK RWNPEVQFTSNCGNQSSMLWAPDTTGKYTEPRVIGSRYLTNHL (配列番号 82)
hu.31	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPNGGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKRRLLEPLG LVEEAAKTAP GKRRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGSQPAKKK LNFGQTGDTE SVPDPQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH EGCLPPFPAD VFMI PQYGYL TLNDGSAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV PFHSSYAHSQ SLDRMLNPLI DQYLYLSKT INGSGQNT Q LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP GPSYRQQRVS TTVTQNNNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDREFFPLSGS LIFGKQGTGR DNVDADKVM I TNEEEIKTTN PVATESYQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNG ILPGMVWQDR DVYLQGP IWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPQILIK NTPVPADPPT AFNKDKLNSF ITQYSTGQVS VEI EWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYKSN VEFVAVTEGV YSEPRIGTR YLTRNL (配列番号 83)
rh.31	-	KAYDQQLKAG DNPYLRYNHA DAEFQERLQE DTSFGGNLGR AVFQAKKRVL EPLGLVETPA KTAGPKKRPV DSPDSTSGIG KKGQQPAKKR LNFGQTGDSE SVPDPQPIGE PPAGPSGLGS GTMAAGGGAP MADNNEGADG VGNASGNWHC DSTWLGDRI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSAGSTND NVYFGYSTPW GYFDNRFH CHFSPRDWQRL INNNWGFRPK KLNFKLFNIQ VKEVTTNDGV TTIANNLTST VQVFSSEYQ LPYVLGSAHQ GCLPPFPADV FMIPQYGYLT LNNGSQSVGR SSFYCLEYFP SQMLRTGNNF TFSYTFEDVP FHSSYAHSSQ LDRLMNPLID QYLYLARTQ SNAGGTAGNR ELQFYQGGPT TMAEQAKNWL PGPCFRQQRV SKTLDQNNNS NEAWTGATKY HLNXRNSLVN PGVAMATHKD DEERFFPSSG VLIFGKTGAA NKTTLENVLM TNEEEIRPTN PVATEEYGIV SSNLQAATA AQTVVNNQG ALPGMVWQNR DVYLQGP IWA KIPHTDGNFH PSPLMGGFGL KHPPPQILIK NTPVPANPPE VFTPAKFASF ITQYSTGQVS VEI EWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNFDKQTG VDFAVDSQGV YSEF (配列番号 84)
hu.12	-	MAADGYLPDWLEDTLSEGRQWWKLKPGPPPPKPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGPNGGLD KGEFVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLRYNHADA EFQERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLLEPLGLVEEPVKTAGPKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGHQPAKKRLNFGQTGDAD SVPDPQLGQPAPAPTSLGSTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRI TTSTRTWALPTYNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQRLI NNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQ CLPPFPADVFMV PQYGYL TLNNGSAVGRPSFYCYLEYFSPQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF HSSYAHSSQLDRMLNPLIDQYLYLNRQSNSTGLQQSRLLSQAGPTSMQLAKNWLPG PCYRQRLSKQANDNNNSNFPWTAATKYHLNGRDSLVNPGAMASHKDDDEKFFPMHGTL

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 8】

カブシド 名	挿入または 置換	アミノ酸配列
		IFGKQGTNANDADLEHVMITDEEEIRTTNPVATEQYGNVSNNLQNSNTGPTTENNVNHQGA LPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKIPHDTGHHFSPPLMGGFGLKHPPQIMIKNTPVPANPPTN FSSAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYSKSVNVDFTVDTNGVY SEPRPIGTRYLTRNL (配列番号 85)
hu.13	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPENGLD KGEVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEPVKTA P GKRRPVEHSP AEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQPLGQ PPAAPSGGLGT NTMASGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI NNNWGFRPKR LNFKLFIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT PSGTTTQSR L QFSQAGASDI RDQSRNWLP G PCYRQQRVSK TSADNNNSEY SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL IFGKQSGSEK NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQGGNTQA ATADVNTQGV LPGMVWQDRD VYLQGGPIWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYSKSVNV DFTVDTNGVY SEPRPIGTRY LTRNL (配列番号 85)
hu.21	-	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPENGLDKGEVNEAD AAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADA EFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEPVKT APGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDRPLGQPPAAPSGGLGTNTMASGS GAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYS TPWGYFDNRFHCHFSFPRDWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTD SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYT FEDVPFHSSYHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCY RQQRVSKTAADNNNSDYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKYFPQSGVLIIFGQDSGKTNV DIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQSGNTQAATSDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGGPIWAKI PHDTGHHFSPPLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKEN SKRWNPEIQYTSNYSKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号 74)
hu.26	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPENGLD KGEVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRILEPLG LVEEPVKTA P GKRRPVEHSP AEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQPLGQ PPAAPSGGLGT NTMASGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI NNNWGFRPKR LSFKLFIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT PSGTTTMSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLP G PCYRQQRVSK TAADNNNSDY SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKYFPQSGVL IFGKQDSGKT NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQSGNTQA ATSDVNTQGV LPGMVWQDRD VYLQGGPIWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYSKSVNV DFTVDTNGVY SEPRPIGTRY LTRNL (配列番号 76)
hu.53	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPENGLD KGEVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEPVKTA P GKRRPVEHSP AEPDSSSGTG KAGQQPARKR AEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQPLRQ PPAAPTSLGS TTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSQWLGDRVI TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI NNNWGFRPKR LNFKLFIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLNRTQT ASGTQQSRL L FSQAGPTSMS LQAKNWLP GP CYRQQRLSKQ ANDNNNSNFP WTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFPMHGT LI FGKEGTNATN AELENVMITD EEEIRTTNPV ATEQYGYVSN NLQNSNTAAS TETVNHQ GAL PGMVWQDRDV YLQGGPIWAKI PHDTGHHFHP SPLMGGFGLKH PPPQIMIKN PVPANPPTNF SSAKFASFIT QYSTGQVSVE IEWELQKENS KRWNPEIQY SNYSKSVNV DFTVDTNGVYS EPRPIGTRY LTRNL (配列番号 77)
hu.56	-	MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY KYLGPENGLD KGEVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEPVKTA P GKRRPVEHSP VEPDSSSGTG KAGNQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQPLGQ PPASPSGLGT NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRV V TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YFDNRFHCH FSPRDWQRLI

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 9】

カブシド 名	挿入または 置換	アミノ酸配列
		NNNWGFRPKR LNFKLFNIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDLEYQL PYVLGSAHQG CLPPFPADVF MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFFPS QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TAAADNNNSEY SWTGATKYHL NGRDSLVPNG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL IFGKGQSEKT NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQSGNTQA ATSDVNTQGV LPGMVWQDRD VYLQGPWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY TSNYNKSVNV DFTVDTNGVY SEPRPIGTRY LTRNL (配列番号 86)
Rh.64R 1	R697W	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWDLKPGAP KPKANQQKQD DGRGLVLPGY KYLGPFNGLD KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADAEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEGAKTAP GKRRPVEPSF QRSPPDSSTGI GKKGQQPARK RLNFQGTGDS ESVPDPQPIG EPPAAPSSVG SGTMAAGGGA PMADNNEGAD VGSSSGNWH CDSTWLGDRI ITTSTRTWAL PTYNNHLYKQ ISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ RLINNNGWGR PKRLSFKLEN IQVKEVTQNE GTKTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA HQGCLPPFPF DVFMIQYGY LTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFSFSYTFED VPFHSSYAHS QSLDRLMNPL IDQYLYLSR TQSTGGTAGT QQLLFSQAGP SNMSAQARNW LPGPCYRQQRVSTTSLQNNN SNFAWTGATK YHLNGRDSL NPGVAMATNK DDEDRFFPSS GILMFGKQGA GKDNVDYSNV MLTSEEEIKT TNPVATEQYG VVADNLQQQN TAPIVGAVNS QGALPGMVWQ NRDVYLQGP WAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPPPQIL IKNTPVADP PTAFAQAKLN SFITQYSTGQ VSVIEIVWELQ KENSKRWNPE (配列番号 90)
AAV9. N272A .496N NN/A AA498	N272A 498_NNN/ AAA_500	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPFNGLD 60 KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADAEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKRRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVDPDPPIGE PPAAPSGVGS LTMAAGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGSSN DAAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTST TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PPHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQAAASE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADKVM TNEEEIKTTN PVATESYQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNGQ 600 ILPGMVWQDR DVYLQGPWAK KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYKSNN VEFVANTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (配列番号 91)
AAV9. G266A .496N NN/A AA498	G266A 498_NNN/ AAA_500	MAADGYLPDW LEDNLSEGIR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLPGY KYLGPFNGLD 60 KGEFVNAADA AALEHDKAYD QQLKAGDNPY LRYNHADAEF QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ 120 AKKRLLEPLG LVEEAAKTAP GKRRPVEQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKKR LNFGQTGDTE 180 SVDPDPPIGE PPAAPSGVGS LTMAAGGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWHC DSQWLGDRI 240 TTSTRTWALP TYNNHLYKQI SNSTSGSSN DNAYFGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 300 LINNNWGFRP KRLNFKLFNI QVKEVTDNNG VKTIANNLTST TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360 EGCLPPFPAD VFMIPQYGYL TLNDGSQAVG RSSFYCLEYF PSQMLRTGNN FQFSYEFENV 420 PPHSSYAHSQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKT INSGGQNQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480 GPSYRQQRVS TTVTQAAASE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKEG EDRFFPLSGS 540 LIFGKQGTGR DNVDADKVM TNEEEIKTTN PVATESYQV ATNHQSAQAQ AQTGWVQNGQ 600 ILPGMVWQDR DVYLQGPWAK KIPHTDGNFH PSPLMGGFGM KHPPPPQILIK NTPVPADPPT 660 AFNKDKLSF ITQYSTGQVS VEIEWELQKE NSKRWNPEIQ YTSNYKSNN VEFVANTEGV 720 YSEPRPIGTR YLTRNL (配列番号 92)
Rh.46		MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPNGLD KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFSGGNLGRAVFQ AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKRRPVEPSQPQRSPPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFQGTGDS ESVPDPQPIGEPPAAPSSVSGGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRI ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSPRDWQ RLINNNGWGRPKRLSFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFFPSQMLRTGNNFNSFSYTFED VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPSNMSAQARNW LPGPCYRQQRVSTTSLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATNKDDEDRFFPSS GILMFGKQAGKDNVDYSNVMLTSEEEIKATNPVATEQYGVVADNLQQQNTAPIVGAVNS QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPPLMGGFGLKHPPPPQILIKNTPVADP PTAFAQAKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYKSTNVDFAVNTE GYSEPRPIGTRYLTRNL (配列番号 93)

10

20

30

40

【0 2 4 5】

7. 均等物

本発明は、その具体的な実施形態を参照して詳細に説明されているが、機能的に均等である類型が本発明の範囲内であることが理解される。実際、本明細書に示され、説明されるものに加えて、本発明の様々な修正は、前述の説明及び添付の図面から当業者に明らかであろう。そのような修正は、添付される特許請求の範囲の範囲内であることが意図される。当業者は、本明細書に記載の本発明の具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識するか、または慣用的な実験を超えるものを使用せずに確認することができる。そのような等価物は、以下の特許請求の範囲によって網羅されることが意図される。

50

【0246】

本明細書で言及されている全ての刊行物、特許及び特許出願は、各個々の刊行物、特許または特許出願が、その全体が参照により本明細書に組み込まれることが具体的かつ個別に同じ程度で、本明細書に参照により本明細書に組み込まれる。

【0247】

本明細書における議論は、当該技術分野が直面している問題の本質をよりよく理解することを提供し、いかなる方法においても、先行技術に関する認めるものとして解釈されるべきではなく、また、本明細書におけるいかなる参考文献の引用も、そのような参考文献が本出願の「先行技術」を構成するという認めるものとして解釈されるべきではない。

【0248】

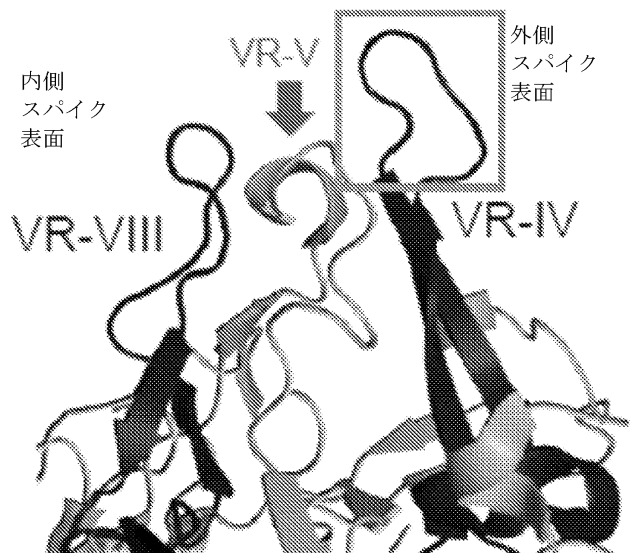
本明細書で引用される特許出願及び刊行物を含む全ての参考文献は、各個々の刊行物または特許または特許出願が、全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているかのように、その全体が、全ての目的のために、参照により本明細書に組み込まれる。本発明の多くの修正及び変形は、当業者に明らかであるように、その趣旨及び範囲から逸脱することなく行うことができる。本明細書に記載の具体的な実施形態は、例としてのみ提供され、本発明は、添付の特許請求の範囲の条件、ならびにそのような特許請求の範囲が権利を有する等価物の全範囲によってのみ制限されるべきである。

【図面】

【図1】

コンセンサス	VR-V
1. AAV1 カプシド	YVRRRTQ-NQSSAONKIDLLFSGSAGNVPKRW
2. AAV2 カプシド	YVRRRTN-TPSRTTQSRITQFAGASDIRDQSRNW
3. AAV3 カプシド	YVRRRTQGTTSRTTQSRITLFSAGQSSMLQARNW
4. AAV4 カプシド	YVRRRTQGTTSRTTQSRITLFSAGQSSMLQARNW
5. AAV5 カプシド	YVRRRTQGTTSRTTQSRITLFSAGQSSMLQARNW
6. AAV6 カプシド	YVRRRTQGTTSRTTQSRITLFSAGQSSMLQARNW
7. AAV7 カプシド	YVRRRTQGTTSRTTQSRITLFSAGQSSMLQARNW
8. AAV8 カプシド	YVRRRTQGTTSRTTQSRITLFSAGQSSMLQARNW
9. AAV9 カプシド	YVRRRTQGTTSRTTQSRITLFSAGQSSMLQARNW
10. AAVrh.10 カプシド	YVRRRTQGTTSRTTQSRITLFSAGQSSMLQARNW

【図2】



10

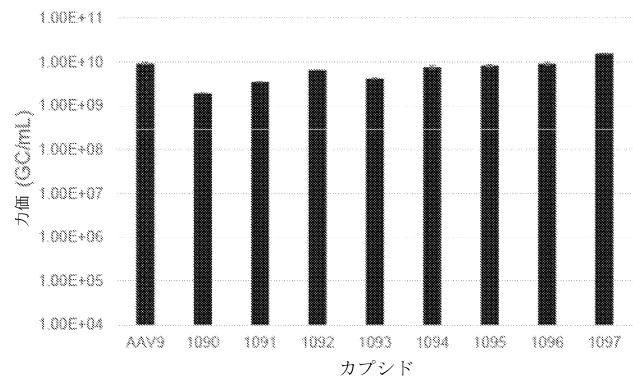
20

30

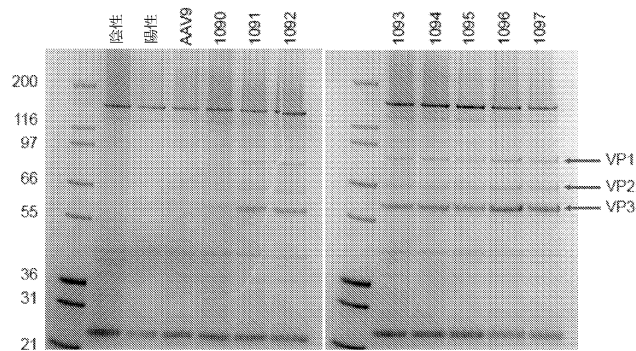
40

50

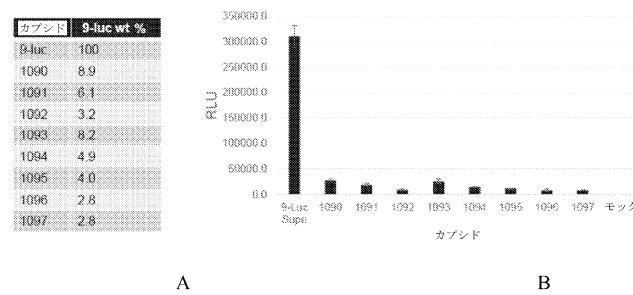
【図 3】



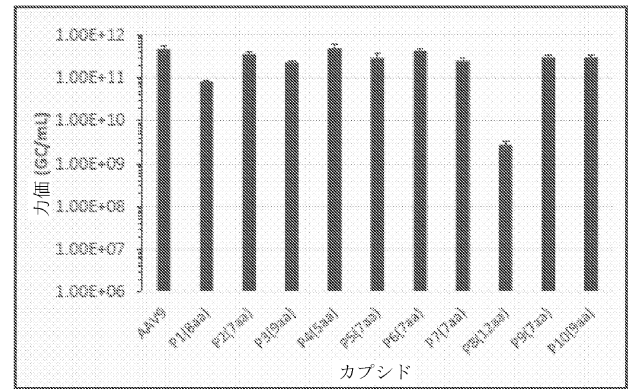
【図 4】



【図 5】



【図 6 A】



10

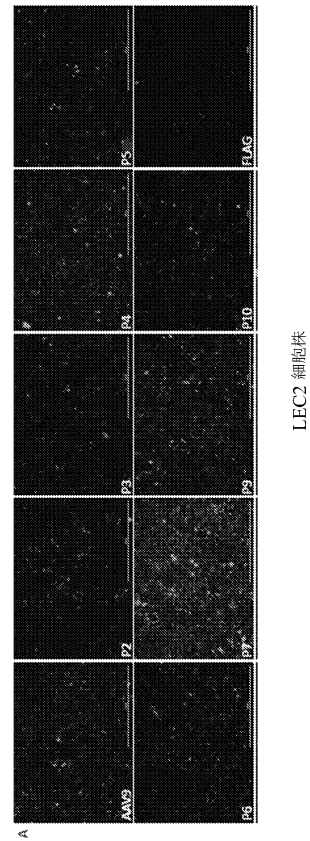
20

30

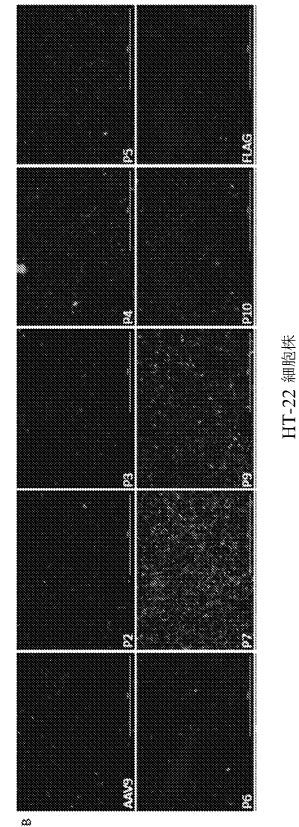
40

50

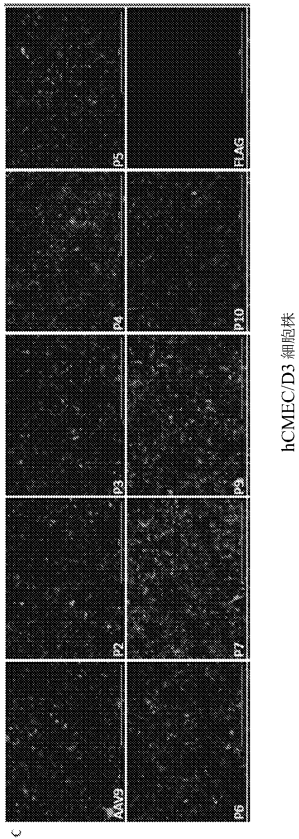
【図 6 B】



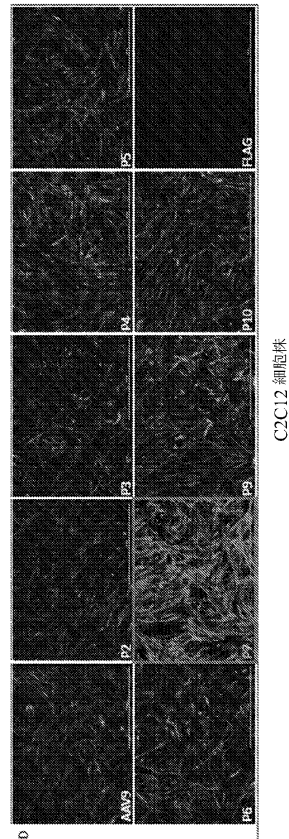
【図 6 C】



【図 6 D】



【図 6 E】



10

20

30

40

50

【図 7 - 2】

KGEFVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ 120
KGEFVNEADAAALEHDKAYDROLQSCDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ 120

AAV1	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
AAV2	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
AAV3	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
AAV3-3	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
AAV4	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
AAV4-4	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	119
AAV5	KGPFVNADAVAREHEDTSYNEQLAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	119
AAV6	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
AAV7	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
AAV8	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
AAV9	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
rh.10	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
rh.20	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
rh.39	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
rh.73	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
rh.74v1	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
rh.74v2	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
hu.12	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
hu.26	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
hu.26	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
hu.37	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
hu.51	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120
hu.53	KGPFVNADAAALEHDKAYDQOLKAGDNPLYRYNHAADAFQERLQEDTSFGGNGLRAVFQ	120

hu.21 AKKRILPLGLVEEPVKIKPKGKKRPVEHSPA-EPDSSSGTGKAGQQPARKKLNFQGTGDA 179

hu.26 AKKRILEPLGLVEEPVKIKPKGKKRPVEHSPA-EPDSSSGTGKAGQQPARKKLNFQGTGDA 179

hu.37 AKKRVLPLGLVEEPVKIKPKGKKRPVEHSPKPSDSSGTCCKKGOOPAKKLNFQGTGDS 180

【圖 7 - 4】

AAV1	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	357
AAV2	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	357
AAV3	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	356
AAV3-3	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	356
AAV3B	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	356
AAV3C	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	356
AAV4-4	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	356
AAV5	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	357
AAV6	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	347
AAV7	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	358
AAV8	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	359
AAV9e	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	358
rh. 10	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	358
rh. 20	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	359
rh. 39	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	359
rh. 73	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	359
rh. 73	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	359
rh. 74w2	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	359
hu. 12	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	359
hu. 21	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	356
hu. 26	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	356
hu. 37	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	359
hu. 37	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	356
hu. 53	QRLNNNGWGRFKPLNFKLPINQVEVINDCVTTIANNLSTVQVFTDSYQLPVLGSS	356

AAV5 GLEGCLAFPPQVFLFLPQIGATLNKNDI--SNPIERSSFCELEIFPSAMLRIGNNFTFSY 414
AAV6 AHQGCPLPPFADVFMIPQYGYLTNNNG---SQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNTFFSY 414
AAV7 AHQGCPLPPFADVFMIPQYGYLTNNNG---SQSGVRSSFYCLEYFSPQMLRTGNNTFFSY 415

【図 7 - 5】

[illegible]

AAV1	QPKMWLPGCYRQVRVKSTLNNNNNSF----	FWTGAASKYHLNGRSLVNGVMAASHK	528
AAV2	QSNWLPGCYRQVRVKSTLNNNNNSF----	FWTGAASKYHLNGRSLVNGVMAASHK	528
AAV3	QARWMLPGCYRQVRLKSTANNNNNSF----	FWTAAASKYHLNGRSLVNGVMAASHK	528
AAV3-3	QAKMWLPGCYRQRLKSTLNNNNNSF----	FWTAAASKYHLNGRSLVNGVMAASHK	528
AAV3B	QAKMWLPGCYRQRLKSTLNNNNNSF----	FWTAAASKYHLNGRSLVNGVMAASHK	528
AAV4	FKMKWLPGLSKIQGFGSKTANQYKIPATGSDSLIKETHTSLDGRWALTEGPPMATACTG		528
AAV4-4	FKMKWLPGLSKIQGFGSKTANQYKIPATGSDSLIKETHTSLDGRWALTEGPPMATACTG		528
AAV5	FTWTFWFGCMGRGQWLGSCVGNLNSF----	FAATATNRSLGASQVTFPGMGTN	514
AAV6	QPKMWLPGCYRQVRVKSTLNNNNNSF----	FWTGAASKYHLNGRSLVNGVMAASHK	528
AAV7	QAKWMLPGCPFRQVRVKLTLDNNNNNSF----	AWTGAATKYHLNGRSLVNGVMAATHK	530
AAV8	QAKMWLPGCYRQVRVSTLNNNNNSF----	AWTACTKYHLNGRSLVNGVMAATHK	530
AAV9	CGRMNYPGSPRQVRVSTVTLNNNNNSF----	AWPGASSWALNGRSLVNGVMAASHK	528
AAV9e	CGRMNYPGSPRQVRVSTVTLNNNNNSF----	AWPGASSWALNGRSLVNGVMAASHK	528
rh.10	QAKMWLPGCYRQVRVSTLNNNNNSF----	AWTGAATKYHLNGRSLVNGVMAATHK	530
rh.11	QAKMWLPGCYRQVRVSTLNNNNNSF----	AWTGAATKYHLNGRSLVNGVMAATHK	530
rh.39	QAKMWLPGCYRQVRVSTLNNNNNSF----	AWTGAATKYHLNGRSLVNGVMAATHK	530
rh.73	QARWMLPGCYRQVRVSTLNNNNNSF----	AWTGAATKYHLNGRSLVNGVMAATHK	530
rh.74v1	QAKMWLPGCYRQVRVSTLNNNNNSF----	AWTGAATKYHLNGRSLVNGVMAATHK	530
rh.74v2	QAKMWLPGCYRQVRVSTLNNNNNSF----	AWTGAATKYHLNGRSLVNGVMAATHK	530
rh.12	QAKMWLPGCYRQRLSKQANDNNNSF----	FWTAAATKYHLNGRSLVNGVMAASHK	527
rh.13	QSNWLPGCYRQVRVKSTLNNNNNSF----	FWTGAASKYHLNGRSLVNGVMAASHK	528
rh.26	QSNWLPGCYRQVRVKSTLNNNNNSF----	FWTGAASKYHLNGRSLVNGVMAASHK	528
rh.37	QAKMWLPGCYRQVRVSTLNNNNNSF----	AWTGAATKYHLNGRSLVNGVMAATHK	530
rh.51	QSNWLPGCYRQVRVKSTLNNNNNSF----	FWTGAASKYHLNGRSLVNGVMAASHK	528
rh.53	QAKMWLPGCYRQRLSKQANDNNNSF----	FWTGAATKYHLNGRSLVNGVMAASHK	527

【圖 7 - 6】

AAV1	DEDEFFPFMSGVMLPKGSAGAA--SNTALNVLMDTDEEIKATNPVATEQGVSYVNNL	584
AAV2	DEDEFFPFMSGVMLPKGSQGEK--INVDIKVIMTDEEIRITNPVATEQGVSYVNNL	585
AAV3	DEDEFFPFMSGVMLPKGSGETTA--SNAELNVLMDTDEEIRITNPVATEQGVTVANNL	586
AAV3-3	DEDEFFPFMSGVMLPKGSGETTA--SNAELNVLMDTDEEIRITNPVATEQGVTVANNL	585
AAV3B	DEDEFFPFMSGVMLPKGSGETTA--SNAELNVLMDTDEEIRITNPVATEQGVTVANNL	586
AAV4	FADSKFN-SLI FAPGQGAQ--TAPVSKVIMTDEEIRIETLANALPMWNGNGL	587
AAV4-4	FADSKFN-SLI FAPGQGAQ--TAPVSKVIMTDEEIRIETLANALPMWNGNGL	588
AAV5	LQGSNTVALENTMIFNSQFANGTITATYLEGNMLTISESTQFNVRYAVNGQGMATNN	574
AAV6	DEDEKFFPFMSGVMLPKGSAGAA--SNTALNVLMDTDEEIKATNPVATERFGTVANNL	585
AAV7	DEDEKFFPFMSGVMLPKGTGATG--KTLNVLNMDTDEEIRITNPVATEQGVSYVNNL	586
AAV8	DEDEKFFPFMSGVMLPKGQNAAR--DNADVSYMLTDEEIKITNPVATEQGVADVNL	587
AAV9	DEDEKFFPFMSGVMLPKGQGAQ--DNADVSYMLTDEEIKITNPVATEQGVADVNL	588
th.10	DEDEKFFPFMSGVMLPKGQGAQ--DNADVSYMLTDEEIKITNPVATEQGVADVNL	585
th.20	DEDEKFFPFMSGVMLPKGQGAQ--DNADVSYMLTDEEIKITNPVATEQGVADVNL	587
th.39	DEDEKFFPFMSGVMLPKGQGAQ--DNADVSYMLTDEEIKITNPVATEQGVADVNL	587
th.73	DEDEKFFPFMSGVMLPKGQGAQ--DNADVSYMLTDEEIKITNPVATEQGVADVNL	587
th.73-1	DEDEKFFPFMSGVMLPKGQGAQ--DNADVSYMLTDEEIKITNPVATEQGVADVNL	587
th.74-2	DEDEKFFPFMSGVMLPKGQGAQ--DNADVSYMLTDEEIKITNPVATEQGVADVNL	587
hu.12	DEDEKFFPMHGLTIFKSGGTTA--SNAELNVLMDTDEEIRITNPVATEQGVSYVNNL	584
hu.21	DEDEKYFPGSGVLMFGQDSGE--INVDIKVIMTDEEIRITNPVATEQGVSYVNNL	584
hu.26	DEDEKYFPGSGVLMFGQDSGE--INVDIKVIMTDEEIRITNPVATEQGVSYVNNL	584
hu.37	DEDEKFFPFMSGVLMFGQGAQ--DNADVSYMLTDEEIKITNPVATEQGVADVNL	587
hu.51	DNDEKFFPFMSGVLMFGQGESE--INVDIKVIMTDEEIRITNPVATEQGVSYVNNL	584
hu.53	DEDEKFFPMHGLTIFKSGGTTA--SNAELNVLMDTDEEIRITNPVATEQGVSYVNNL	584

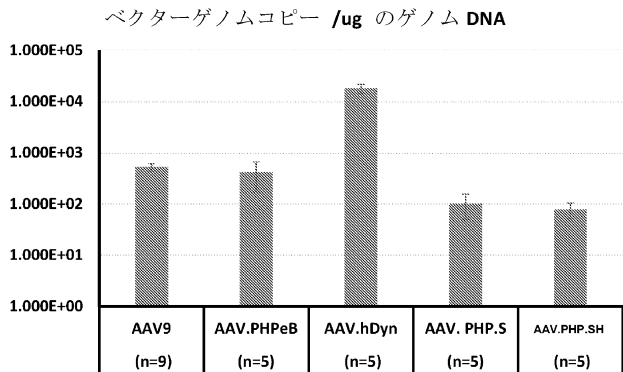
10

【圖 7-7】

AAV1	QILIKNTVFANFNPFAFPAFTKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	705
AAV2	QILIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	706
AAV3	QILIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	707
AAV3-3	QIMIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	708
AAV4	QIMIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	709
AAV4	QILIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	710
AAV4	QILIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	711
AAV5	MMLIKNTVFENGI-IFSPDVISFPIQYSTQGVTVENWLOKNSKNNPPIQYTSN	693
AAV6	QILIKNTVFANFNPFAFPAFTKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	705
AAV7	QILIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	706
AAV8	QILIKNTVFADPPTTFNQSLNFSPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	707
AAV9	QILIKNTVFADPPTTFNQSLNFSPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	708
th.10	QILIKNTVFADPPTTFNQSLNFSPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	709
th.10	QILIKNTVFADPPTTFNQSLNFSPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	710
th.20	QILIKNTVFADPPTTFNQSLNFSPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	711
th.39	QILIKNTVFADPPTTFNQSLNFSPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	712
th.73	QILIKNTVFADPPTTFNQSLNFSPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	713
th.74v1	QILIKNTVFADPPTTFNQSLNFSPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	714
th.74v2	QILIKNTVFADPPTTFNQSLNFSPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	715
th.71	QILIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	705
th.72	QILIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	706
th.74	QILIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	707
th.76	QILIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	708
th.77	QILIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	709
th.78	QILIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	710
th.83	QILIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	711
th.85	QIMIKNTVFANFNPFTTSAAKAFASPIQYSTQGVSVIENWLOKNSKNNPPIQYTSN	704

AAV1	AKSANVDFVTVDNGLYSEPRIGTRYLTRL	736	(配列番号59)
AAV2	NKSNVDFVTVDNGYSEPRIGTRYLTRL	735	(配列番号60)
AAV3	NKSNVDFVTVDNGYSEPRIGTRYLTRL	736	(配列番号61)
AAV3-3	NKSNVDFVTVDNGYSEPRIGTRYLTRL	736	(配列番号78)
AAV3B	NKSNVDFVTVDNGYSEPRIGTRYLTRL	736	(配列番号87)
AAV4	QGNLSLWAFDAGKYTEPRAIGTRYLTHL	734	(配列番号62)
AAV4-4	QGNLSLWAFDAGKYTEPRAIGTRYLTHL	734	(配列番号79)
AAV5	QKQFVDFAFDSGCTYEPRAIGTRYLTRL	735	(配列番号63)
AAV6	AKSANVDFVTVDNGLYSEPRIGTRYLTRL	736	(配列番号64)
AAV7	EQKQGVDFAVDSQGVYSEPRIGTRYLTRL	737	(配列番号65)
AAV8	YKSTSVDFVAANTGVSEPRIGTRYLTRL	738	(配列番号66)
AAV9	YKSNVDFVAANTGVSEPRIGTRYLTRL	736	(配列番号67)
AAV9e	YKSNVDFVAANTGVSEPRIGTRYLTRL	736	(配列番号68)
rh_10	YKSNVDFVAANTGVSEPRIGTRYLTRL	736	(配列番号69)
rh_20	YKSNVDFVAANTGVSEPRIGTRYLTRL	738	(配列番号70)
rh_29	YKSNVDFVAANTGVSEPRIGTRYLTRL	738	(配列番号73)
rh_73	YKSNVDFVAANTGVSEPRIGTRYLTRL	738	(配列番号88)
rh_74v1	YKSNVDFVAANTGVSEPRIGTRYLTRL	738	(配列番号72)
rh_74v2	YKSNVDFVAANTGVSEPRIGTRYLTRL	738	(配列番号80)
hu_12	NKSNVDFVTVDNGYSEPRIGTRYLTRL	735	(配列番号75)
hu_21	NKSNVDFVTVDNGYSEPRIGTRYLTRL	735	(配列番号76)
hu_26	NKSNVDFVTVDNGYSEPRIGTRYLTRL	735	(配列番号76)
hu_37	NKSNVDFVAANTGVSEPRIGTRYLTRL	738	(配列番号71)
hu_51	NKSNVDFVTVDNGYSEPRIGTRYLTRL	736	(配列番号89)
hu_53	NKSNVDFVTVDNGYSEPRIGTRYLTRL	737	(配列番号77)

【圖 8】



30

【図 9】

AAV9-TLAAPFK (配列番号 1)

MAADGYLPDW LEDNLSEGR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLFQY KYLPSPGNGLD 60
 KGFVNAADA AALEHDKAYD QOLKAGDNFY LKYNHADAEP QERLKEDTSF GGNLGRAVFO 120
 AKKRLLEPLG LVSEAAXTAP GKRRPVQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKRR LNFQGTGDTIE 180
 SVPTDQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWAC DSQWLGDRVI 240
 TTSRTWALP TYNNHLYQOI SNSTSGGSSN DNAYPGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 300
 LINNNWGFEP KRLNFKLFNI QVQVTDNNG VKTIANNLIS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360
 SGCLPFPFAD VFMLPQYGL TLNDGSAVG KSSFYCLSYF PSQMLRTGNN PQSYYPFENV 420
 PFSSYAASQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKI LNSGQQQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480
 GFSYRQQRVS TTVTONNSE FAWPGASSWA LNGRNSLMNP GPAMASHKSG EDREFFELSGS 540
 LIFGKQCTGR DNVDADAVHI TNSEELKTIN PVATIESYGV AINHOSATL AAFPKAQAQT 600
 GWVQNGILP GWVQDQDQVY LQGPINAKIP HTDGNFHPSE LMGGFGMKHP PFQILIKNTP 660
 VQADPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENSX RNWFEIQYTS NYYKSNVVEF 720
 AVNTEGVISE PRPIGIRYLT RNL (配列番号 125)

A (Q588 と A589 との間の TLAAPFK (配列番号 1) 挿入)

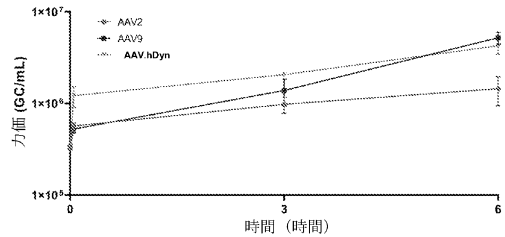
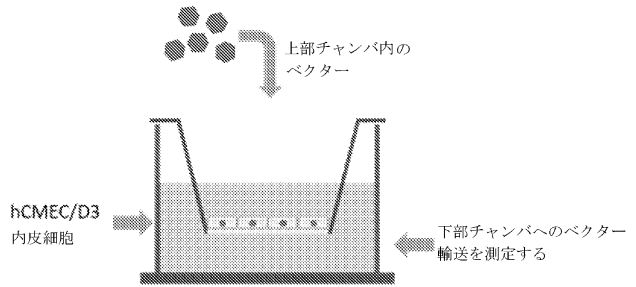
MAADGYLPDW LEDNLSEGR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLFQY KYLPSPGNGLD 60
 KGFVNAADA AALEHDKAYD QOLKAGDNFY LKYNHADAEP QERLKEDTSF GGNLGRAVFO 120
 AKKRLLEPLG LVSEAAXTAP GKRRPVQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKRR LNFQGTGDTIE 180
 SVPTDQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWAC DSQWLGDRVI 240
 TTSRTWALP TYNNHLYQOI SNSTSGGSSN DNAYPGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 300
 SFRDWORLIN NNWGFREKRL NEKLENIQVK EVDNNGVKI IANNLTSIVO VFTDSYQLP 360
 YVLGSAHEGC LPFPFADVFV IPQYGYLTLN DGSQAVGRSS FYCLEYFESQ MLRTGNNFQF 420
 SVFLENVPPH GSVASHQSGLD XLNPLIDQY LYLSKTING SGQNGQTLKP SVAGPSNMAV 480
 QGRNYIPGS YRQQRVSTTV TQNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNEGPA MASHKEGEDR 540
 FFLPSGSLIF CKQCTGADNV DADKVMITNE EELKTINPVA TESYQVATN HQSAQAQAQT 600
 GWVQNGILP GWVQDQDQVY LQGPINAKIP HTDGNFHPSE LMGGFGMKHP PFQILIKNTP 660
 VQADPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENSX RNWFEIQYTS NYYKSNVVEF 720
 AVNTEGVISE PRPIGIRYLT RNL (配列番号 126)

B (S268 と S269 との間の TLAAPFK (配列番号 1) 挿入)

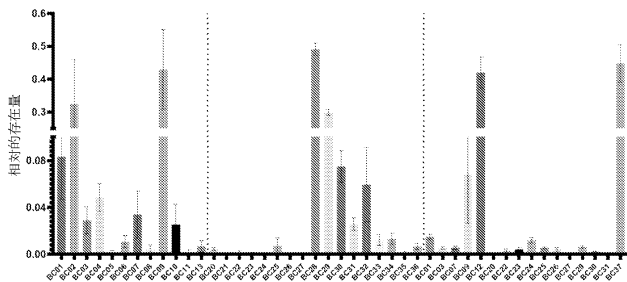
MAADGYLPDW LEDNLSEGR EWWALKPGAP QPKANQQHQD NARGLVLFQY KYLPSPGNGLD 60
 KGFVNAADA AALEHDKAYD QOLKAGDNFY LKYNHADAEP QERLKEDTSF GGNLGRAVFO 120
 AKKRLLEPLG LVSEAAXTAP GKRRPVQSP QEPDSSAGIG KSGAQPAKRR LNFQGTGDTIE 180
 SVPTDQPIGE PPAAPSGVGS LTMASSGGAP VADNNEGADG VGSSSGNWAC DSQWLGDRVI 240
 TTSRTWALP TYNNHLYQOI SNSTSGGSSN DNAYPGYSTP WGYFDNRFH CHFSPRDWQR 300
 LINNNWGFEP KRLNFKLFNI QVQVTDNNG VKTIANNLIS TVQVFTDSY QLPYVLGSAH 360
 SGCLPFPFAD VFMLPQYGL TLNDGSAVG KSSFYCLSYF PSQMLRTGNN PQSYYPFENV 420
 PFSSYAASQ SLDRLMNPLI DQYLYLSKI LNSGQQQQT LKFSVAGPSN MAVQGRNYIP 480
 GFSYRQQRVS YRQQRVSTTV TQNNSEFAW PGASSWALNG RNSLMNEGPA MASHKEGEDR 540
 FFLPSGSLIF CKQCTGADNV DADKVMITNE EELKTINPVA TESYQVATN HQSAQAQAQT 600
 GWVQNGILP GWVQDQDQVY LQGPINAKIP HTDGNFHPSE LMGGFGMKHP PFQILIKNTP 660
 VQADPTAFN KDKLNSFITQ YSTGQVSVEI EWELQKENSX RNWFEIQYTS NYYKSNVVEF 720
 AVNTEGVISE PRPIGIRYLT RNL (配列番号 127)

C (S454 と G455 との間の TLAAPFK (配列番号 1) 挿入)

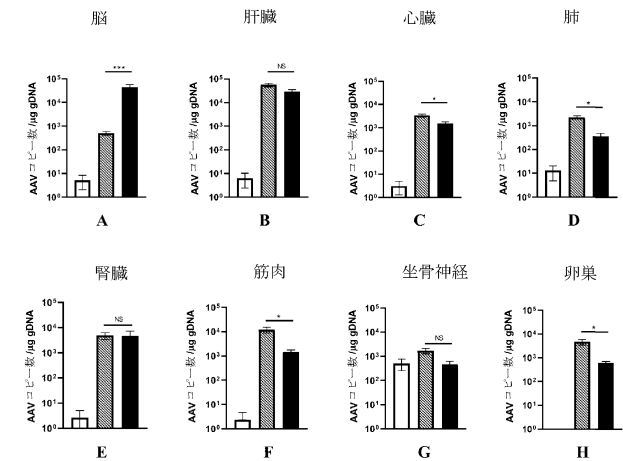
【図 10】



【図 11】

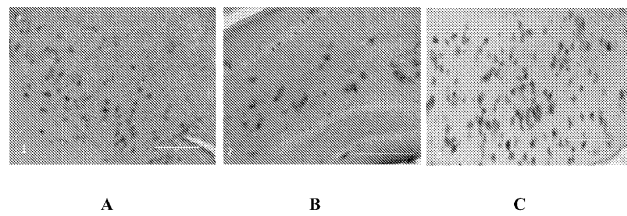


【図 12】

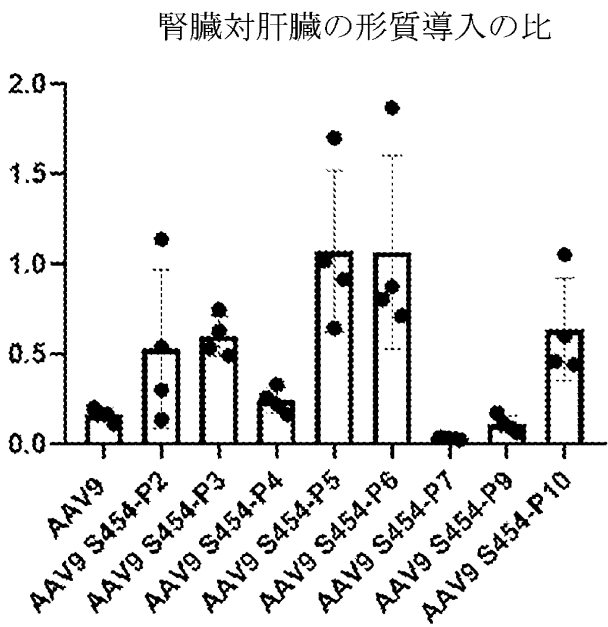


□ ナイーブ ■ AAV9 ■ AAV.hDyn

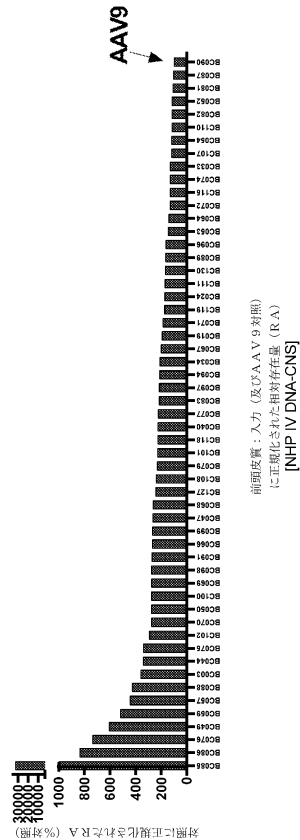
【図 1 3】



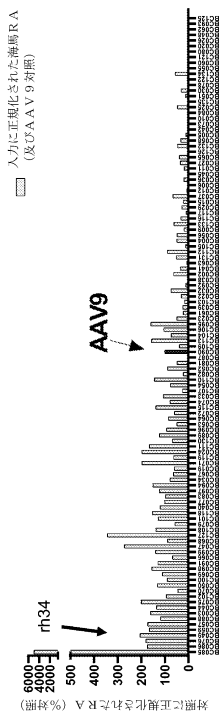
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

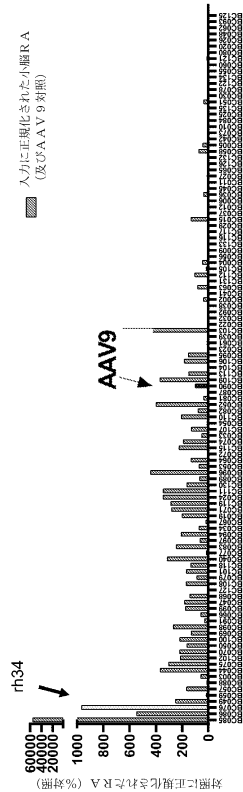
20

30

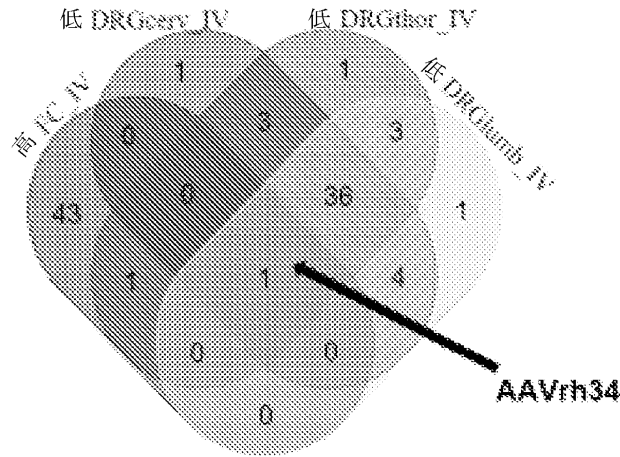
40

50

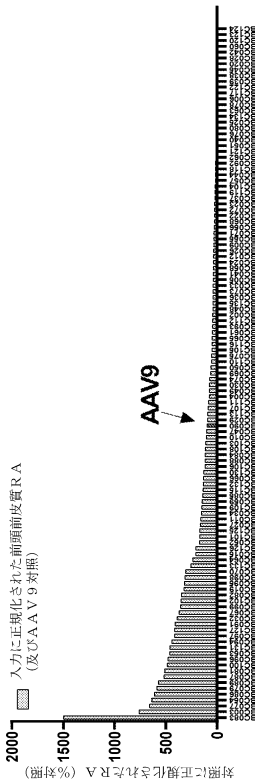
【図 17】



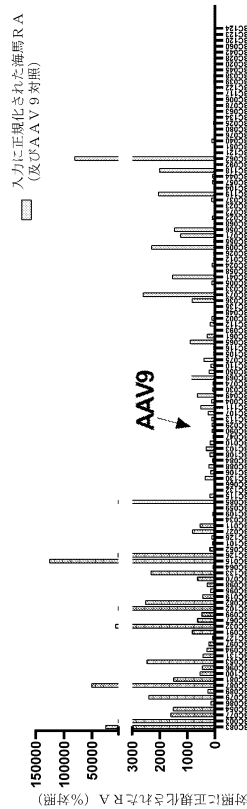
【図 18】



【図 19】



【図 20】



10

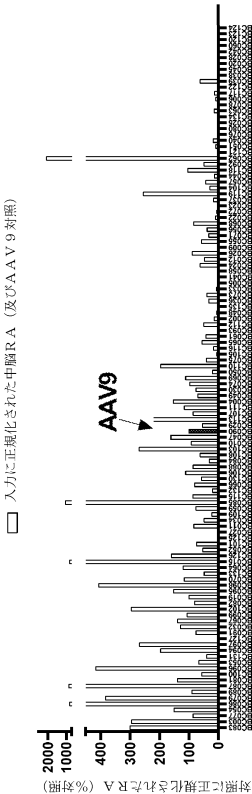
20

30

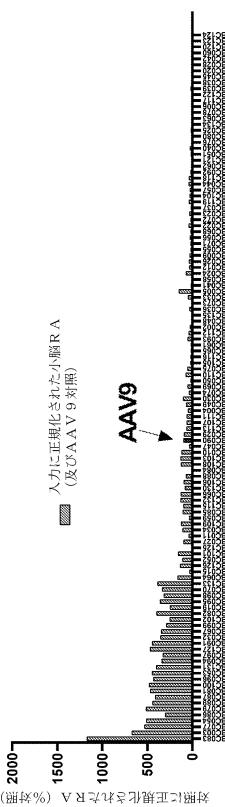
40

50

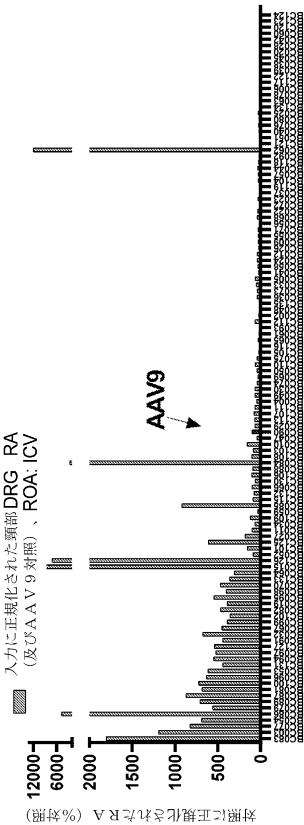
【図 2 1】



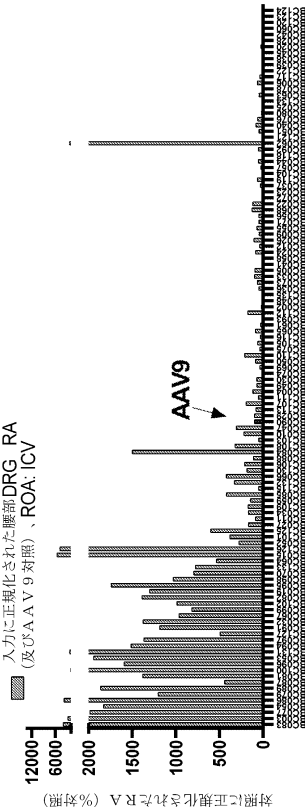
【図 2 2】



【図 2 3】



【図 2 4】



10

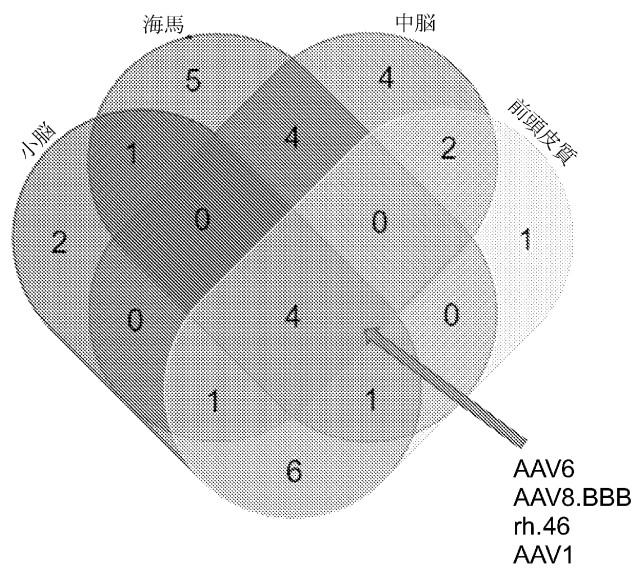
20

30

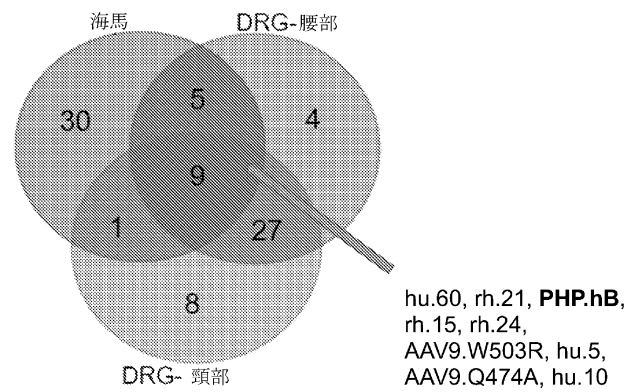
40

50

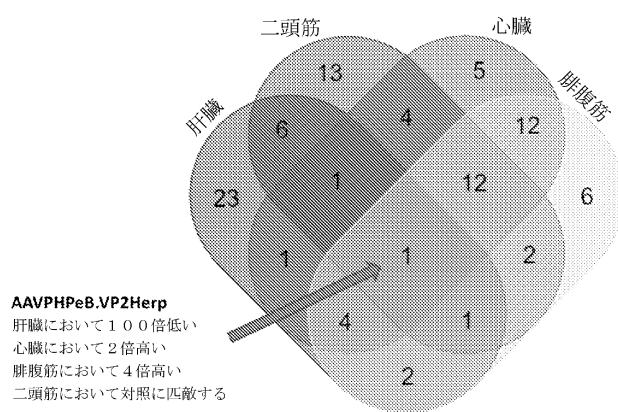
【図 2 5】



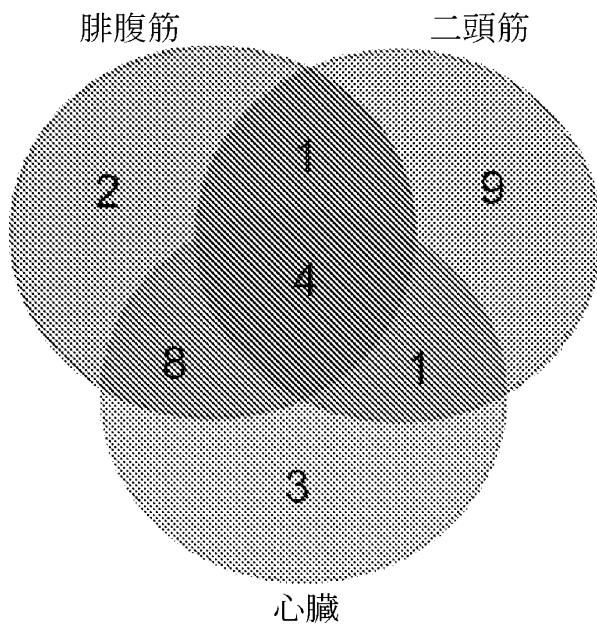
【図 2 6】



【図 2 7】



【図 2 8】



10

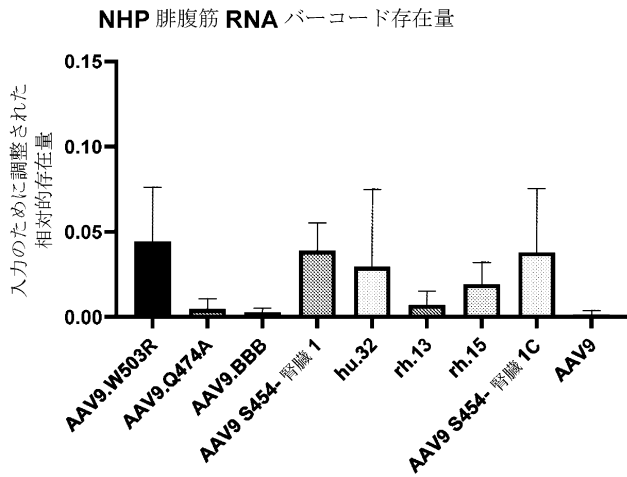
20

30

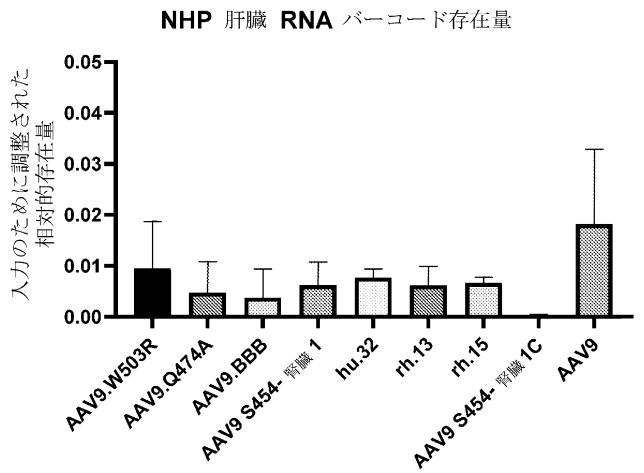
40

50

【図 29 A】

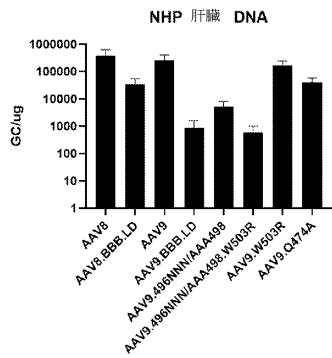


【図 29 B】

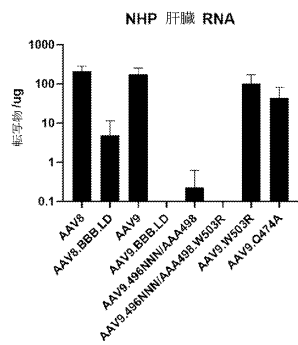


10

【図 30】

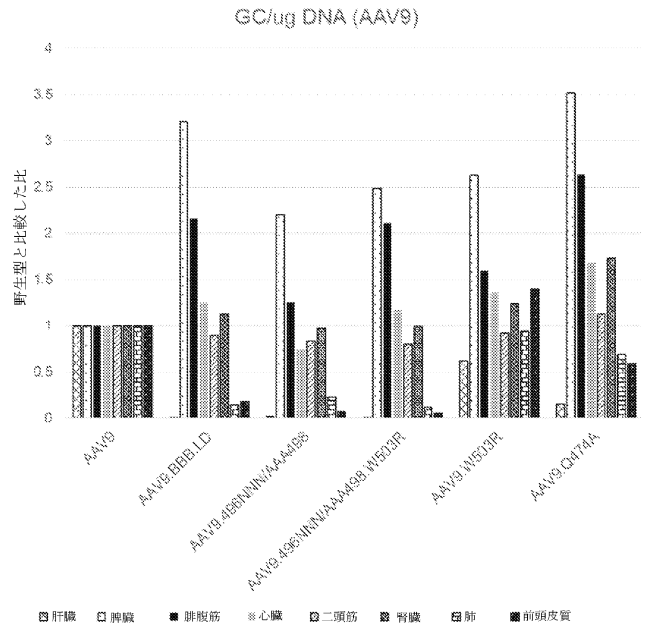


A



B

【図 31】



肝臓 脾臓 膵臓 心臓 二頭筋 腎臓 肺 前頭皮質

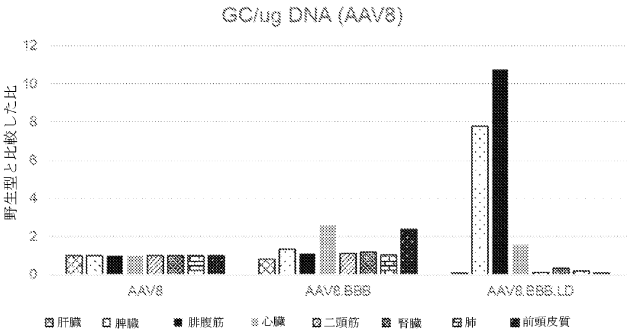
20

30

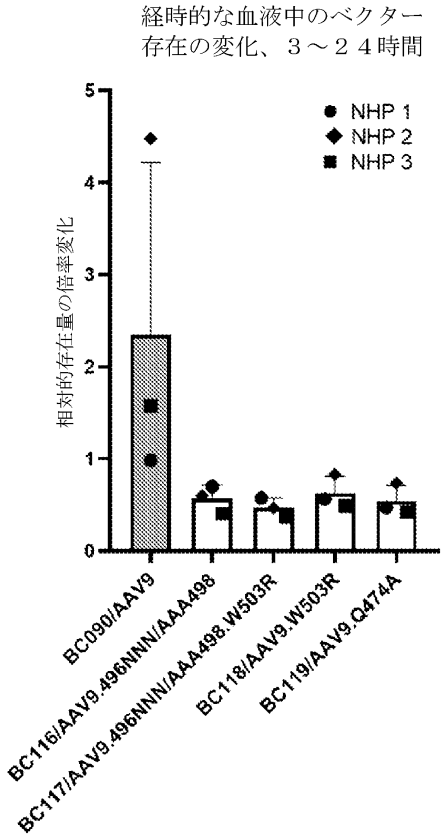
40

50

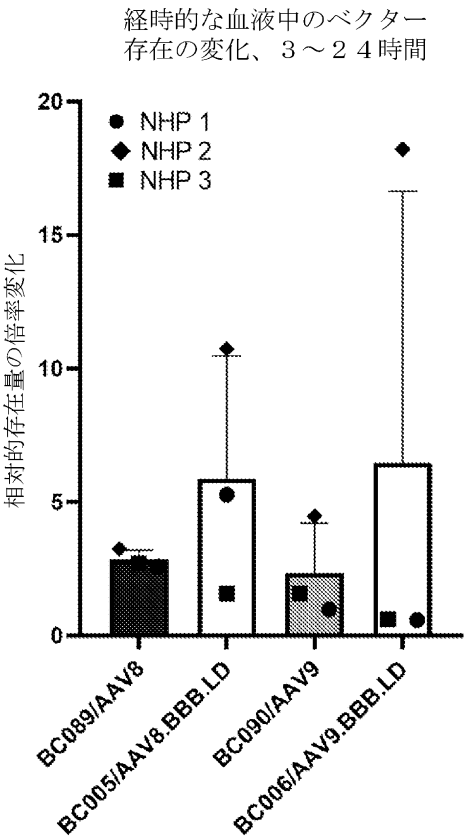
【図 3 2】



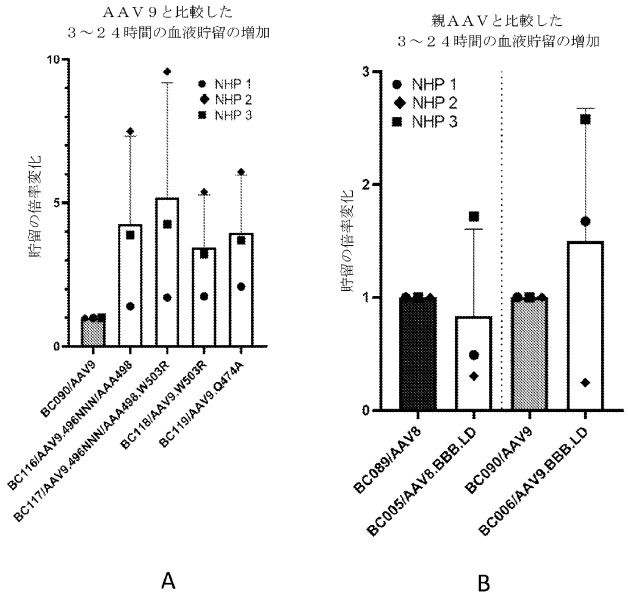
【図 3 3 A】



【図 3 3 B】



【図 3 4】



10

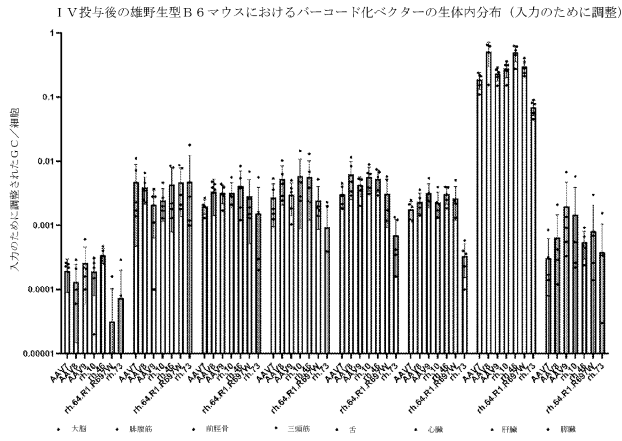
20

30

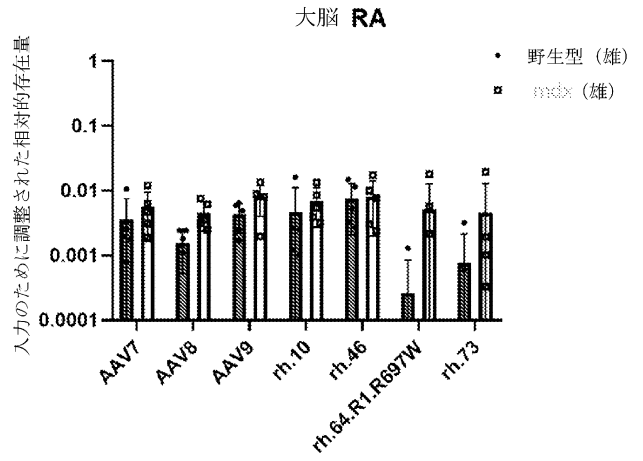
40

50

【図 3 5】

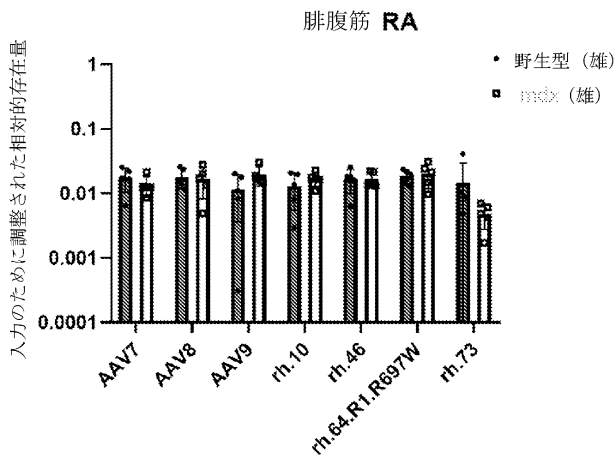


【図 3 6 A】

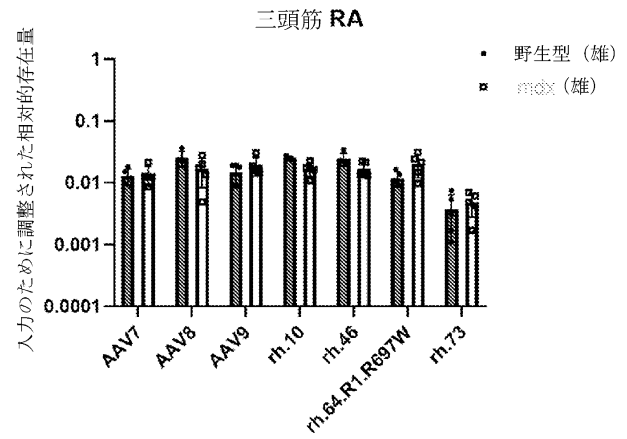


10

【図 3 6 B】



【図 3 6 C】



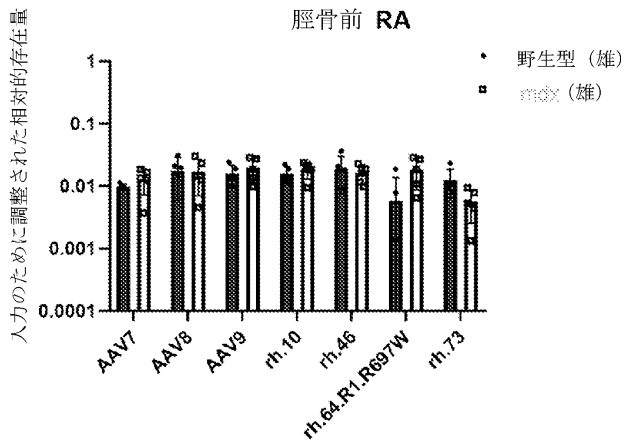
20

30

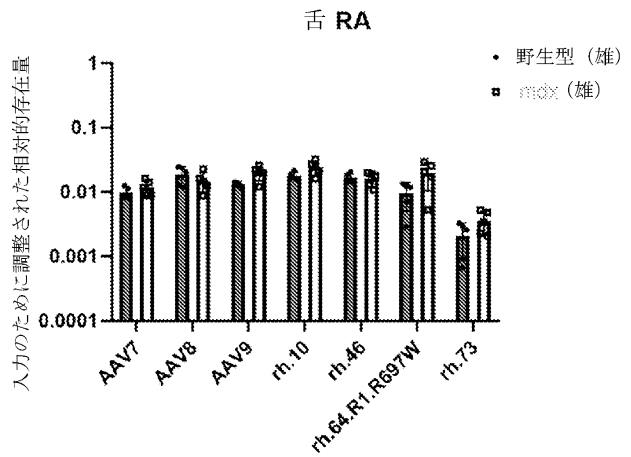
40

50

【図 3 6 D】

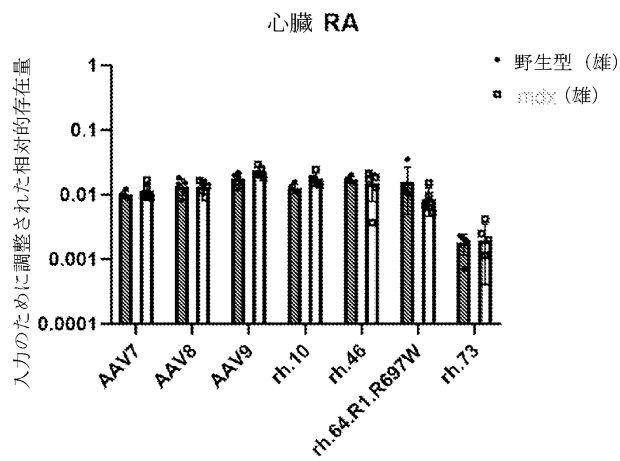


【図 3 6 E】

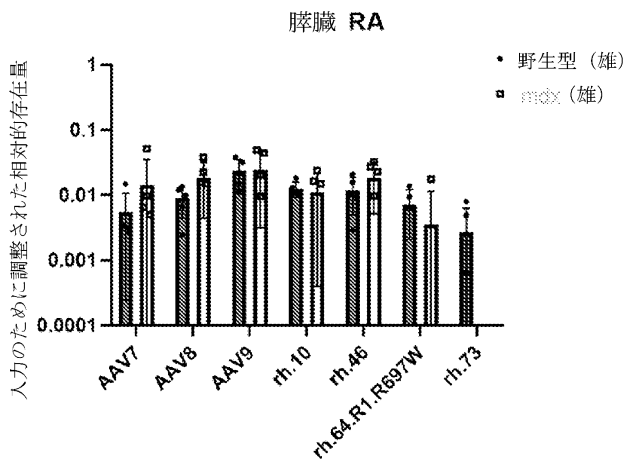


10

【図 3 6 F】



【図 3 6 G】



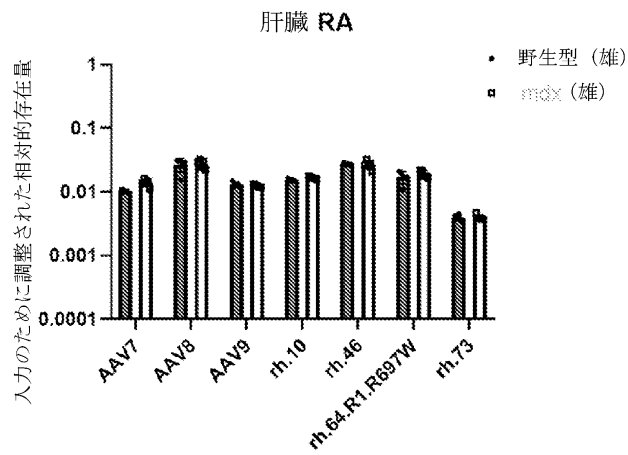
20

30

40

50

【図 3 6 H】



10

【配列表】

2023545384000001.app

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/054058

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/005 A61P21/00 A61P25/00 C12N15/86 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61P C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/152333 A1 (UNIV NORTH CAROLINA CHAPEL HILL [US]) 23 August 2018 (2018-08-23) claims; examples; sequence 34 -----	1-42
X,P	WO 2020/206189 A1 (REGENXBIO INC [US]) 8 October 2020 (2020-10-08) paragraph [00241] - paragraph [00248]; claims; examples ----- -/--	1-42
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 2 February 2022		Date of mailing of the international search report 04/04/2022
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sommer, Birgit

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/054058

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GILES A ET AL: "Mapping an Adeno-associated Virus 9-specific Neutralizing Epitope to Develop Next-Generation Gene Delivery Vectors", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 92, no. 20, 8 August 2018 (2018-08-08), pages 1-20, XP055699487, US ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.01011-18 abstract, results, discussion; -----	1-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/054058

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/054058**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-42 (partially)

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2021/054058

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-42 (partially)

a recombinant AAV capsid protein according to claim 1, in which the rAAV capsid protein is an AAV9 capsid protein (SEQ ID NO: 67) with S263G/S269R/A273T substitutions, preferably an AAV9.BBB.ID capsid (SEQ ID NO: 29), as well as subject-matter related thereto;

2. claims: 1-42 (partially)

a recombinant AAV capsid protein according to claim 1, in which the rAAV capsid protein is an AAV9 capsid protein (SEQ ID NO: 67) with a G266A substitution, preferably an AAV9.G266A.496-NNN/AAA-498 capsid (SEQ ID NO: 92), as well as subject-matter related thereto;

3. claims: 1-42 (partially)

a recombinant AAV capsid protein according to claim 1, in which the rAAV capsid protein is an AAV9 capsid protein (SEQ ID NO: 67) with a N272A substitution, preferably an AAV9.N272A.496-NNN/AAA-498 capsid (SEQ ID NO: 91) as well as subject-matter related thereto;

4. claims: 1-42 (partially)

a recombinant AAV capsid protein according to claim 1, in which the rAAV capsid protein is an AAV9 capsid protein (SEQ ID NO: 67) with a W503R substitution, preferably an AAV9.W503R capsid (SEQ ID NO: 33), as well as subject-matter related thereto;

5. claims: 1-42 (partially)

a recombinant AAV capsid protein according to claim 1, in which the rAAV capsid protein is an AAV9 capsid protein (SEQ ID NO: 67) with a Q474A substitution, preferably an AAV9.Q474A capsid (SEQ ID NO: 34) as well as subject-matter related thereto;

6. claims: 1-42 (partially)

a recombinant AAV capsid protein according to claim 1, in which the rAAV capsid protein is an AAV9 capsid protein (SEQ ID NO: 67) with 496-NNN/AAA-498 substitutions, preferably an AAV9.496-NNN/AAA-498 capsid (SEQ ID NO: 31 or 32) as well as subject-matter related thereto;

10

20

30

40

50

International Application No. PCT/US2021/054058

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

7. claims: 1, 2, 4-42(all partially)

a recombinant AAV capsid protein according to claim 1, in which the rAAV capsid protein is an AAV9 capsid protein (SEQ ID NO: 67) which has an insertion of the peptide TLAAPFK (SEQ ID NO: 1), as well as subject-matter related thereto;

8. claims: 1-42(partially)

a recombinant AAV capsid protein according to claim 1, in which the rAAV capsid protein is an AAV8 capsid protein (SEQ ID NO: 66) with an A269S substitution, preferably an AAV8.BBB.LD capsid (SEQ ID NO: 27) as well as subject-matter related thereto;

9. claims: 1-42(partially)

a recombinant AAV capsid protein according to claim 1, in which the rAAV capsid protein is an AAV8 capsid protein (SEQ ID NO: 66) with 498-NNN/AAA-500 substitutions, as well as subject-matter related thereto;

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/054058

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018152333 A1	23-08-2018	AU 2018221738 A1	22-08-2019
		BR 112019016769 A2	26-05-2020
		CA 3052829 A1	23-08-2018
		CN 110520536 A	29-11-2019
		EA 201991911 A1	20-02-2020
		EP 3583220 A1	25-12-2019
		JP 2020505936 A	27-02-2020
		KR 20190117571 A	16-10-2019
		SG 11201907298W A	27-09-2019
		US 2019367562 A1	05-12-2019
		WO 2018152333 A1	23-08-2018
WO 2020206189 A1	08-10-2020	CA 3135798 A1	08-10-2020
		CN 114127089 A	01-03-2022
		EP 3947420 A1	09-02-2022
		TW 202102526 A	16-01-2021
		WO 2020206189 A1	08-10-2020

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/76 (2015.01)	A 6 1 K	35/76	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00	
C 1 2 N	5/16 (2006.01)	C 1 2 N	5/16	
C 1 2 N	15/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/10	2 0 0 Z

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,N
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K
E,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,N
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. プルロニック

- アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 8 0 4
(72)発明者 ヨスト, サマンサ
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 8 0 4
(72)発明者 マーサー, アンドリュウ
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 8 0 4
(72)発明者 リウ, イェ
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 8 0 4
(72)発明者 ブルーダー, ジョセフ
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 8 0 4
(72)発明者 カルムチルーメレチル, スバ
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 8 0 4
(72)発明者 フィルンバーク, エラド
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 8 0 4
(72)発明者 キアン, ランドルフ
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 8 0 4
(72)発明者 テペ, エープリル, アール.
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 8 0 4
(72)発明者 エグレイ, ジェニファー, エム.
アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 0 , ロックビル, メディカル センター ドライブ 9 8 0 4

F ターム (参考) 4B065 AA93X AA93Y AA95X AA95Y AC14 AC20 BA01 CA24 CA27 CA44
4C084 AA13 MA66 NA13 NA14 ZA02 ZA94
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA66 NA13 NA14 ZA02 ZA94
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA01 EA20 EA21 FA74